

## Циклические биоизостеры производных пуриновой системы и фармацевтическая композиция на их основе

### Область техники

Изобретение относится к медицине, в частности, к фармацевтическим композициям для лечения различных заболеваний, более точно - к лекарственным средствам, оказывающим выраженное нормализующее действие на внутриклеточные процессы, в частности, устранение внутриклеточного метаболического ацидоза и связывание избыточно образующихся свободных радикалов..

### Предшествующий уровень техники

Известно, что гомеостатическими параметрами, обеспечивающими выживание организма и неразрывно связанными между собой, являются, главным образом, содержание газов  $O_2$  и  $CO_2$  в крови, содержание электролитов  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  и кислотно-основное состояние клетки. Содержание газов в крови характеризует окислительно-восстановительные процессы в клетке, кислород является важным участником процесса окисления, а двуокись углерода – продуктом окислительных реакций. Электролиты составляют основу внеклеточной и внутриклеточной среды, основу для клеточной интеграции, для функционирования нервной и мышечной тканей.

Содержание ионов водорода  $H^+$  объективно характеризует кислотно-основное равновесие: ионы водорода обеспечивают связь между электролитами и газами крови при помощи буферной системы ( $HCO_3^- - CO_2$ ). Кроме того, от содержания ионов водорода  $H^+$  зависит деятельность ферментативных систем: ферменты обычно наиболее активны в узком диапазоне концентрации ионов водорода. Для каждого фермента существует определенный интервал значений pH, в котором фермент проявляет максимальную активность, например, для  $\alpha$ -амилазы слюны и для каталазы pH 6,8-7,0, уреазы pH 7,0-7,2, для трипсина pH 7,5 – 8,5, за пределами этих интервалов активность ферментов резко снижается.

Влияние изменений pH среды на состояние молекулы фермента обусловлено, в частности, степенью ионизации  $COOH$ - групп дикарбоновых аминокислот,  $SH$ - групп цистеина, имидазольного азота гистидина,  $NH_2$ -группы лизина и других групп. При значительном отличии pH среды от оптимальных значений ферменты подвергаются конформационным изменениям, приводящим к потере активности вследствие денатурации или изменения заряда молекулы фермента. При различных значениях pH

среды активный центр фермента может быть в частично ионизированном или неионизированном состоянии, что сказывается на третичной структуре белка и, соответственно, на формировании активного фермент-субстратного комплекса.

Кроме того, pH среды оказывает влияние и на степень ионизации субстратов и коферментов.

Для клетки важным является поддержание кислотно-щелочного равновесия - образования ионов водорода  $H^+$  и их выведения из клетки. Абсолютное или относительное увеличение концентрации водородных ионов в среде делает ее кислой, а уменьшение - щелочной. Концентрация  $H^+$  в плазме крови при нормальном состоянии организма составляет около  $10^{-7}$ . Значение pH крови очень стабильно, в норме оно колеблется от pH 7,35 до pH 7,45. Отклонение pH приводит к нарушению функционирования клеток и, прежде всего, их многочисленных ферментных систем, изменению направленности и интенсивности окислительно-восстановительных процессов, например, способности гемоглобина связывать и отдавать кислород. При этом изменяются все обменные процессы и, в первую очередь, водного и электролитного обмена, нарушается чувствительность клеточных рецепторов, меняется проницаемость мембран, нервно-мышечная возбудимость и проводимость.

В поддержании постоянства нормальных для жизнедеятельности значений pH крови и тканей участвуют физиологические системы: легкие, печень, почки, желудочный тракт, и буферные системы: гемоглобиновая, бикарбонатная, белковая и фосфатная. Буферные системы достаточно эффективно и быстро предотвращают сдвиг кислотно-основного равновесия, но они не в состоянии поддерживать его в течение длительного периода без участия физиологических систем.

В случаях, когда возможности вышеуказанных компенсационных систем по поддержанию концентрации ионов водорода исчерпаны, нарушается кислотно-основное равновесие, и при этом может возникать два разных состояния: ацидоз, когда концентрация ионов водорода выше оптимальной концентрации, то есть pH ниже оптимальных значений, и алкалоз. Снижение pH ниже 6,8 несовместимо с жизнью.

Метаболический ацидоз - самая тяжелая и наиболее часто встречающаяся форма нарушения кислотно-основного состояния. Причинами метаболического ацидоза могут быть гипоксии любого происхождения: экзогенная, циркуляторная, дыхательная, тканевая, гемическая, а также сахарный диабет, голодание, лихорадка, почечная недостаточность, длительная диарея, обширные воспаления, например, перитонит, передозировка хлорида кальция, и другие заболевания. К компенсации

ацидоза подключаются почки и печень: активируется ацидо- и аммиогенез в почечных канальцах, если метаболический ацидоз не является следствием почечной недостаточности, а также усиливается реасорбция бикарбоната в почках и выделение его из печени.

Концентрация ионов  $K^+$  в плазме, как правило, повышается вследствие их вытеснения из клеток ионами  $H^+$ . Белки, связывая ионы  $H^+$ , освобождают в плазму ионы  $K^+$  и  $Na^+$ . Повышение осмотического давления плазмы за счет гипернатримии способствует перемещению воды из клеток и развитию гиперосмолярного синдрома.

При метаболическом ацидозе возникают и патологические изменения: сосуды, как правило, расширяются при умеренном снижении рН и суживаются при выраженном ацидозе, при уменьшении сосудистого тонуса артериальное и венозное давление снижается, уменьшается венозный возврат крови к сердцу, в результате чего уменьшается ударный и минутный объем сердца. Уменьшается чувствительность миокардиоцитов к ионам кальция и к адреналину, что сопровождается снижением сократительной способности миокарда.

Гиперкалемия с содержанием в плазме ионов  $K^+$  более 5,2 mmol/l влечет за собой нарушение нервно-мышечной возбудимости и проводимости и обуславливает такие симптомы, как повышение тонуса поперечно-полосатой мускулатуры, рвота, диарея, психические расстройства, нарушение чувствительности, брадикардию, экстрасистолию. При повышении концентрации ионов  $K^+$  в плазме более 7,5 mmol/l возможно развитие мерцания желудочков сердца и остановка его в диастоле, а также паралич скелетной мускулатуры. Усиливается агрегация и агглютинация тромбоцитов, возникающие микротромбы еще больше нарушают микроциркуляцию, усугубляя гипоксию, вызывают нарушение метаболических процессов и усиливают ацидоз.

В результате нарушения деятельности сердца, периферического кровообращения вторично нарушается функция почек, печени, центральной нервной системы. В тяжелых случаях развивается кома, может наступить остановка дыхания.

При чрезмерном снижении рН в клетке - менее 6,8 - разрушаются лизосомы, и клетки подвергаются аутолизу под влиянием лизосомальных ферментов.

Разработка достоверных методов прижизненной рН-метрии клеток позволила установить, что изменения внутриклеточного рН<sub>i</sub> сопровождают многие важнейшие процессы на клеточном уровне. Ряд факторов свидетельствуют о том, что для нормальной жизнедеятельности клеток и тканей организма поддержание рН<sub>i</sub> в

определенном диапазоне является необходимым. Причиной этого может быть, в частности, высокая чувствительность основных клеточных ферментов к значению  $pH_i$ . Так, известно, что активность одного из ключевых ферментов гликолиза 6-фосфофруктокиназы [2.7.1.11] возрастает в десятки раз при увеличении  $pH_i$  среды на 0,2 единицы (Trump B.F., Berezsky I.K. The role of altered  $[Ca^{2+}]_i$  regulation in apoptosis, oncosis and necrosis. *Biochem. Biophys. Acta*, 1996, v. 1313, p. 173-178).

Активность пируваткарбоксилазы [6.4.1.1], фосфоорилазы [2.4.1.1], катализирующей метаболизм гликогена, также зависит от величины  $pH_i$ , и их деятельность ингибируется при повышении  $pH_i$  цитоплазмы (Roos A., Boron W.F. Intracellular pH. *Physiol. Rev.*, 1981, v. 61, p. 296-434).

Известно, что существует корреляция между процессами прикрепления клеток субстрата, повышением  $pH_i$  и запуском механизма пролиферации минимально трансформированных клеток (Акопов В.С., Грובה М.Е., Кошевой Ю.В. Внутриклеточный  $pH_i$  и субстратная зависимость пролиферации фибробластов китайского хомячка. *Цитология*, 1991, 33(7), с.86-94; Gillies R.G., Martinez-Zaguilan R., Peterson E.P., Perona R. The role of intracellular pH in mammalian cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 1992, 2, p.159-179; Akatov V.S., Grobova M.E. Activation of intracellular pH regulating systems upon cell adhesion to solid substrate. *Biol. Membr.*, 1993, v.6, p.917-934).

Было показано, что у макрофагов снижение  $pH_i$  ингибирует продуцирование супероксида и фагоцитирующую активность. Кроме того, при активации фагоцитов происходит вывод протонов, что приводит к повышению  $pH_i$  (Kapus A., Romanek R., Qu A.Y., Rotstein O.O., Grinstein S.A. pH-sensitive and voltage-dependent proton conductance in the plasma membrane of macrophages. *J. Gen. Physiol.*, 1993, v.102(4), p. 723-760).

Изменение  $pH_i$  рассматривается в качестве возможного медиатора распластывания и хемотаксиса нейтрофилов, и строгая корреляция  $pH_i$  необходима для успешного выполнения ими микробиоцидной функции (Demaurex N., Downey G., Waddell T., Grinstein S. Intracellular pH regulator during spreading of human neutrophils, *J. Cell. Biol.*, 1996, v.133, p.1381-1402).

На основании вышеперечисленных данных можно сделать достоверный вывод о том, что повышение внутриклеточного  $pH_i$  служит показателем активности клеток. Поэтому, используя знание о величине  $pH_i$  и о путях и методах поддержания этого

параметра в определенном диапазоне можно эффективно воздействовать на внутриклеточные процессы.

Например, известны исследования по разработке лекарственных препаратов, способных избирательно накапливаться в клетках опухолей, отличающихся от нормальных клеток по величине  $pH_i$  (Tannock I.A., Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploration. *Cancer Res.*, 1989, v.49, p.4373-4384; Stabbs M., Rodrigues L., Howl F.A., Wang I., Joeng K.-S., Veech R.L., Griffiths J.R. Metabolic consequences of a reversed pH gradient in rat tumors. *Cancer Res.*, 1994, v.54, p.4011-4016).

Возможность прогнозируемого изменения внутриклеточного  $pH_i$  имеет важное практическое значение для регуляции внутриклеточного метаболизма.

Поэтому разработка фармацевтических композиций, способных эффективно повышать  $pH_i$ , является весьма актуальной задачей.

Известно применение железосодержащих соединений, в том числе, цитрата и ацетата железа и их комбинации, в условиях гиперфосфатемии, в качестве средства снижения удержания фосфора и коррекции метаболического ацидоза при почечной недостаточности (US, 5753706) на основе абсорбции поглощенных фосфатов в кишечнике.

Известна ветеринарная композиция для лечения или предупреждения молочнокислого ацидоза, содержащая альфа-2-адреноцепторный антагонисты из группы имидазолинов, бензодиоксанимидазолинов и бензофуорохинолинов (US, 5196432).

Известен способ защиты клеток человека от необратимых нарушений, вызванных молочнокислым ацидозом вследствие кислородной недостаточности, предпочтительно, клеток центральной нервной системы, заключающийся в введении в организм нетоксичного соединения, способного проникать через мембрану клетки или преодолевать гематоэнцефалический барьер, которое может осуществлять защитную буферную функцию в клетке и тканях, препятствуя повышению концентрации ионов водорода, поддерживая при этом pH в физиологически приемлемых пределах (не ниже 6,8), из группы, включающей  $NH_2CH_2CH_2SO_3H$ ,  $NH_2-C(NH)NH(CH_2)_2SO_3H$  или  $NH_2-C(NH)NH(CH_2)_2SO_3Na$  (US, 5312839, A).

Известно применение производных 1,4-бензоксазина в качестве лекарственного средства для лечения заболеваний, вызванных внутриклеточным ацидозом при миокардиальной ишемии (US, 5597820, A).

Известен препарат гемодинамического действия, представляющий собой водный раствор декстрана с молекулярной массой 40000 с добавлением солей: натрия хлорида, калия хлорида, магния хлорида, кальция хлорида и натрия ацетата, для нормализации кислотно-основного равновесия и электролитного баланса (RU, 2185173, C2). Большая концентрация набора солей по сравнению с препаратами декстран 40 (US) и декстран 70 (USA) лучше компенсирует дефицит солей крови и межтканевой жидкости, эффективнее корректирует метаболический ацидоз. Предположительно, натрий ацетат при введении в организм включается в обмен веществ и анион  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  превращается в воду и углекислый газ, а катион  $\text{Na}^+$  взаимодействует с недоокисленными кислотными продуктами метаболизма и восстанавливает pH среды. Однако, восстановление pH среды не всегда приводит к необратимому восстановлению pH клетки.

Известно применение намацита (карбостимулина), содержащего бикарбонат, соли магния, марганца и цинка и цитрат натрия для интегральной коррекции метаболического ацидоза, при этом активность препарата обусловлена взаимодействием углекислоты с ферментными белками, приводящим к изменению активности ферментов в отношении комплекса реакций карбоксилирования и декарбоксилирования в тканях, ионы магния, марганца и цинка активируют карбоксилазы, а цитрат натрия служит субстратом для реакций цикла трикарбоновых кислот, липогенеза (RU, 2014077, C1).

Известен способ лечения болезни Альцгеймера, вызванной нарушением бета-амилоид-пептидного метаболизма, являющимся результатом внутриклеточного ацидоза, в основном молочнокислого ацидоза, или колебания pH от нормального значения pH 7,3 и кислотным внутриклеточным pH между 5,0 и 7,0, заключающийся во введении пациенту фармакологически эффективного количества щелочного соединения или буфера, способного поднять внутриклеточный pH от pH 7,0 до pH 7,1-7,4 и преодолеть гематоэнцефалический барьер, пройти через клеточную мембрану, уменьшить концентрацию ионов водорода и иметь pKa от 6,8 до 11,4, а именно, соединений из группы гуанидиноэтана сульфата, гуанидиноэтан сульфоновой кислоты и других (US, 5723496).

Известен бикарбонат натрия, который применяют при различных заболеваниях, сопровождающихся выраженным ацидозом, для борьбы с ацидозом при хирургических вмешательствах, а также применяют как антацидное средство при повышенной кислотности желудочного сока, при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной

кишки. Однако при его применении необходимо учитывать, что длительное его введение в организм может привести к некомпенсированному алкалозу, сопровождаемому тяжелыми нарушениями кислотно-основного состояния крови.

Известен препарат трисамин, в качестве активного вещества содержащий три-(оксиметил)аминометан, являющийся антиацидом системного действия (US, 5 256 660, А). Применяют трисамин при острых и хронических заболеваниях, сопровождающихся метаболическим и смешанным ацидозом. Препарат применяют внутривенно в виде 3,66%-ного раствора. Трисамин связывает большое количество ионов  $H^+$  и выводит их с мочой, поэтому его применяют только при нормальной функции почек, с другой стороны, трисамин способствует увеличению содержания ионов  $HCO_3^-$  в крови. Однако трисамин противопоказан при нарушении выделительной функции почек и нарушениях функции печени. Поскольку препарат вызывает также угнетение дыхания, то больным с недостаточностью вентиляции легких его вводят только в условиях управляемого или вспомогательного дыхания.

В настоящее время в медицинской практике устранение метаболического ацидоза осуществляют в несколько этапов. На начальном этапе применяют растворы бикарбоната натрия или трисамин.

На следующем этапе проводят мероприятия, направленные на нормализацию гемодинамики и газообмена, на улучшение микроциркуляции крови и обменных процессов в организме, коррекцию электролитного дисбаланса, а главное, на устранение причины, вызвавшей сдвиг кислотно-основного равновесия.

Известен лекарственный препарат «димефосфон», содержащий в качестве активного вещества диметиловый эфир 1,1-диметил-3-оксобутилфосфоновой кислоты (Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., Медицина, 1993, ч. II, с. 137-140), антиацидотическое действие которого связано с активацией метаболических процессов, регуляцией кислотно-основного состояния организма, в том числе, при пневмонии, острых респираторных заболеваниях. Однако при применении препарата возникают диспепсические расстройства.

Разработка лекарственных препаратов, устраняющих внутриклеточный метаболический ацидоз, и оказывающих нормализующее воздействие на внутриклеточные процессы, является весьма актуальной задачей.

#### Раскрытие изобретения

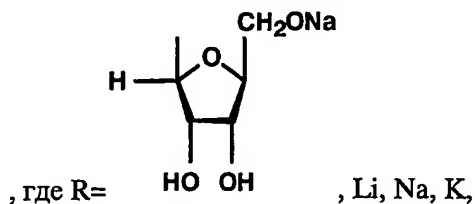
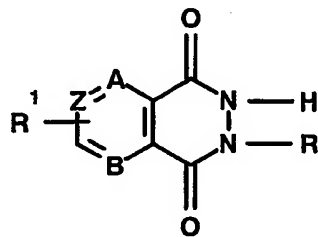
Целью настоящего изобретения является создание лекарственного средства для коррекции нарушений внутриклеточных процессов.

При создании изобретения была поставлена задача создания лекарственного средства на основе соединений, обладающих биологической активностью нормализации кислотно-основного состояния клетки за счет вывода из клетки избыточного количества протонов и повышения тем самым  $pH_i$  клетки, нормализации деятельности ферментативных систем, нормализации направленности и интенсивности окислительно-восстановительных процессов, способностью взаимодействовать с аденозинчувствительными рецепторами на мембране и внутри клетки, а также способностью связывать избыточно образующиеся свободные радикалы.

В качестве биологически активных соединений, обладающих необходимыми для решения указанной задачи свойствами, были рассмотрены производные конденсированных пиридазиндионовых систем, которые, по мнению авторов, могут обладать циклическим изостеризмом по отношению к аденозину, так как они содержат кольцевые системы, сходные с аденозином по размерам и по характеру электронной плотности.

Авторы предположили, что конденсированные пиридазиндионовые системы из-за сходного с аденозином строения могут обладать и сходной реакционной способностью в организме, способны присоединять  $\beta$ -D-рибофуранозные фрагменты, взаимодействовать с чувствительными к аденозину рецепторами и проникать через клеточную мембрану, то есть могут являться биологическим изостерами аденозина. В то же время они являются электрохимически активными соединениями с достаточно низкими потенциалами восстановления и могут присоединять 2-4 протона и электрона, устраняя тем самым внутриклеточный метаболический ацидоз.

Поставленная задача была решена выявлением циклических биоизостеров пуриновой системы, имеющих общую формулу



$R^1 = -H, -NH_2, -Br, -Cl, -OH, -COOH,$

$B = -N=, -CH=, Z = -CH=, -N=,$

$A = -N=$  при  $B = -N=, Z = -CH=,$

$A = -CH=$  при  $B = -N=, Z = -CH=,$

$A = -CH=$  при  $B = -N=, Z = -N=,$

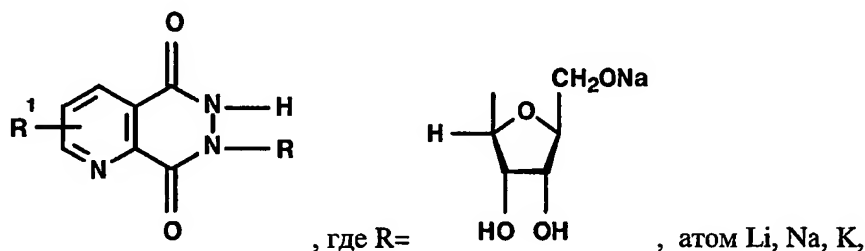


A = -CH= при B = -CH=, Z = -CH=,

A = -CH= при B = -CH=, Z = -N=, и

их фармакологически приемлемых солей, обладающих нормализующим действием на внутриклеточные процессы.

Были синтезированы и исследованы производные пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона, циклического биоизостера производных пуриновой системы, в которых пиридиновое кольцо сконденсировано с пиридазиндионовым кольцом, имеющие общую формулу



R¹ = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH,

в частности:

7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (1),

4-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (2),

3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (3),

4-гидрокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (4),

3-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (5),

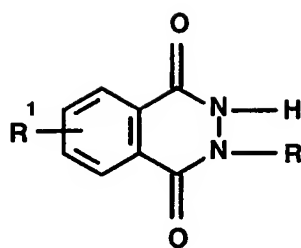
пиридо [2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона литиевая соль (6),

пиридо [2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (7),

пиридо [2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона калиевая соль (8).

А также были синтезированы и исследованы производные бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона, циклического биоизостера производных пуриновой системы, в которых бензольное кольцо сконденсировано с пиридазиндионовым кольцом, имеющие общую формулу:

10

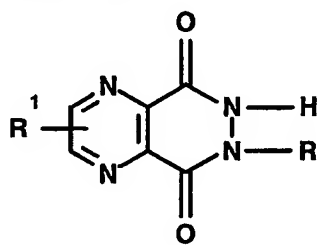
, где R =  , атом Li, Na, K,

R¹ = -H, -NH₂, -Cl, -OH, -COOH,

в частности:

- 2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (9),  
 5-амино-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (10),  
 6-амино-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (11),  
 5-хлор-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (12),  
 5-гидроксид-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона динатриевая соль (13),  
 5-амино-бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона литиевая соль (14),  
 5-амино-бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (15),  
 6-амино-бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона калиевая соль (16),  
 5-гидроксид-бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона динатриевая соль (17),  
 6-карбоксит-бензо[d]-3H-пиридазин-1,4-диона динатриевая соль (18).

Были также синтезированы и исследованы производные пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона, циклического биоизостера производных пуриновой системы, в которых пиразиновое кольцо сконденсировано с пиридазиндионовым, имеющие общую формулу:

, где R =  , атом Li, Na, K,

R¹ = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH,

в частности :

- 7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (19),  
 2-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (20),

3-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (21),

3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (22),

2-гидрокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (23),

2-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (24),

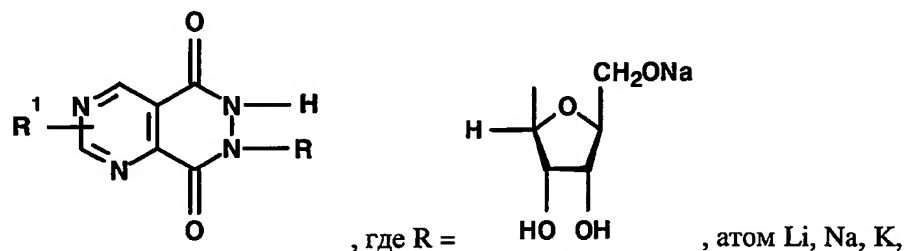
пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона литиевая соль (25),

пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (26),

3-бром-пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона калиевая соль (27),

2-амино-пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (28).

Также были синтезированы и исследованы производные пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона, циклического биоизостера производных пуриновой системы, в которой пиримидиновое кольцо сконденсировано с пиридазиндионовым кольцом, имеющие общую формулу:



$R^1 = -H, -NH_2, -Br, -OH, -COOH,$

в частности:

7-(β-D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (29),

2-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (30),

4-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (31),

2-бром-7-(β-D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (32),

4-гидрокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (33),

4-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (34),

пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона литиевая соль (35),

2-амино-пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (36),

4-бром-пиримидо[4,5-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона калиевая соль (37).

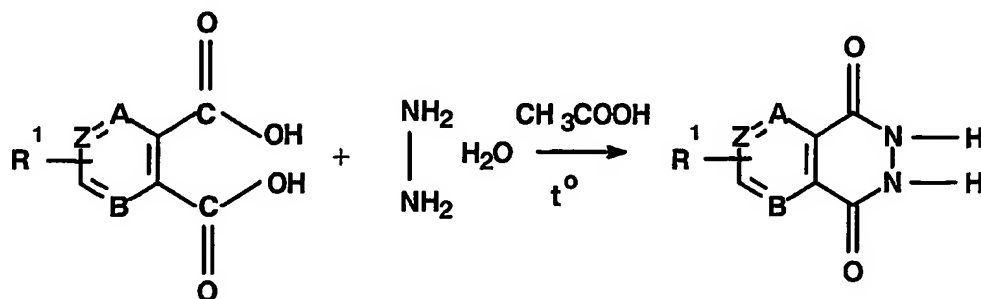
Соединения 1-8, являющиеся производными пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона, получали конденсацией орто-дикарбоксизамещенных пиридинов с гидразин гидратом в среде уксусной кислоты (Taguchi Hiroshi. A new fluorometric assay method for guinolinic acid. *Analitic Biochemistry*, 1983, 131(1), p. 194-197).

Соединения 9-18, являющиеся производными бензо [d]-3Н-пиридазин-1,4-диона (фталазиндиона), получали конденсацией орто-фталевой кислоты с гидразингидратом в среду уксусной кислоты (Huntress E.H., Stanley L.N., Parker A.S. The preparation of 3-Aminophtalhydrazide for use in the Demonstration of Chemiluminescence, *J,Am.Chem. Soc.*, 1994, v.56, p. 241-242).

Соединения 19-28, являющиеся производными пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона, получали конденсацией орто-дикарбоксизамещенных пиразинов гидразингидратом в среде уксусной кислоты ( Zyczynska - Baloniak I., Czajka R., Zinkowska E., Synthesis of Derivatives of 4-Hydroxypyrazine-[2,3-d]pyridazine-1-one. *Polish Journal of Chemistry*. 1978, v.52, p. 2461-2465; Kormendy K., Ruff F. Pyridazines condensed with a Heteroring. III., *Acta Chimika Hungarika*. 1990, 127(2), p. 253-262).

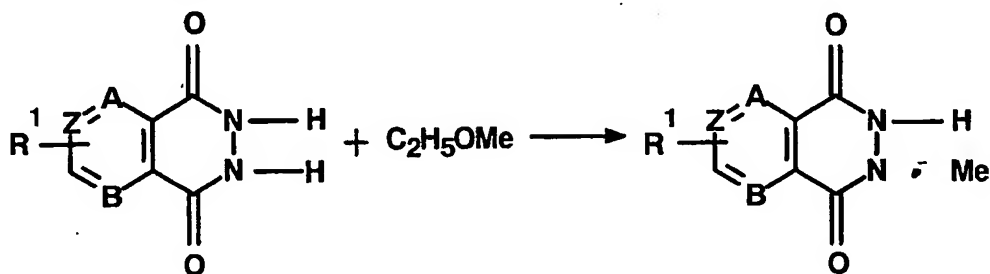
Соединения 29-37, являющиеся производными пиримидо[4,5-d]-6Н- пиридазин-5,8-диона, получали конденсацией орто-дикарбоксизамещенных пиримидинов с гидразингидратом в среде уксусной кислоты ( Yurugi S., Hieda M. Studies on the synthesis of N- Heterocyclic Compounds. *Chemistry, Pharmaceutic Bull.*, 1972, v.20(7), p. 1522-1527, *ibid.*, p.1513-1521).

Синтез указанных соединений проводят в несколько этапов. На первом этапе осуществляют конденсацию орто-дикарбоксизамещенных гетероциклов (пиридина, пиразина, пиримидина) или производных фталевой кислоты с гидразингидратом в среде уксусной кислоты:



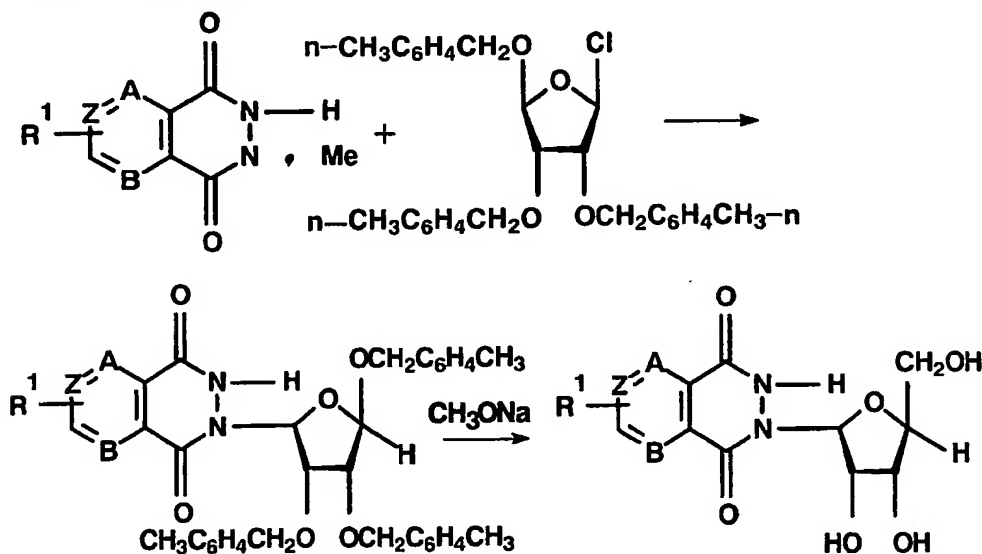
при A, B, Z = -NH=, -CH=, R<sup>1</sup> = -H, -NH<sub>2</sub>, Br-, Cl-, -OH, -COOH.

На втором этапе получают натриевые, калиевые, литиевые соли соответствующего конденсированного пиридазиндиона взаимодействием с соответствующим этилатом:



На заключительном этапе проводят конденсацию соответствующей соли с 1-хлор-2,3,5-три-О-толуоил-β-D-рибофуранозой в среде безводного ДМФА в присутствии катализатора. В качестве катализатора используют 15-краун-5 в случае соли Na или син- цис, анти-цис -дициклогексано-18-краун-6 в случае соли K.

Снятие пара-толуоильной защиты проводят метилатом натрия.



Рибозилирование солей гетероциклических оснований проводят по общей методике:

К смеси 1,0 mmol натриевой соли гетероциклического основания, 1,0 mmol 15-краун-5 в 10,0 ml сухого диметилформамида (далее ДМФА) в атмосфере осушенного аргона прибавляют по каплям при перемешивании 1,0 mmol 1-хлор-2,3,5-три-О-толуоил-β-D-рибофуранозы. Реакционную массу перемешивают 6-10 часов при

температуре 20°C. Затем добавляют 7,0 ml 10%-ного раствора  $\text{NaHCO}_3$  и перемешивают 30 минут при 0°C. К полученной суспензии добавляют 30,0 ml хлороформа, и затем отфильтровывают через Hyflo Super Cel, органический слой отделяют, промывают 10,0 ml воды и сушат  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Полученные нуклеазиды хроматографируют на силикагеле, элюируют  $\text{CHCl}_3$ . Выход нуклеазидов составляет 45-65 %.

Снятие пара-толуоильной защиты проводят по общей методике следующим образом:

Раствор 0,32 mmol нуклеазидов в смеси метанола и диоксана в соотношении 5:1 охлаждают до 0°C и добавляют к нему 0,7 ml 0,1M-ного раствора метилата натрия в метаноле и выдерживают в атмосфере аргона 24 часа при температуре 6°C. Реакционную массу нейтрализуют добавлением DOWEX 50 ( $\text{H}^+$ ) до pH 7,0, смолу отфильтровывают. Конечные продукты выделяют из фильтрата хроматографией на силикагеле. Элюент - смесь  $\text{CHCl}_3$  и MeOH в соотношении 20:1. Выход целевого продукта составляет 66-85 %.

Литиевые, натриевые и калиевые соли получали смешиванием эквимолярных количеств гетероциклических соединений с водным раствором соответствующих гидроксидов. Отгонку воды осуществляли при пониженном давлении без нагревания аналогично известному способу получения щелочных и щелочноземельных солей аминодигидрофалазиндиона (RU, 2169139, C1).

Строение синтезированных соединений было подтверждено данными элементного анализа на приборе EA-11-08 ("Carlo Erba") и хроматомасс-спектрометрии на хроматомасс-спектрометре "Agilent Technologies".

Таблица 1

Результаты масс-спектрометрического исследования  
и элементного анализа соединений 1-37 согласно изобретению

Номер соеди- нения	$(\text{M}+\text{H})^+$	Найдено, %			Брутто-формула	Вычислено, %		
		C	H	N		C	H	N
1	295	45,60	3,90	13,12	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_6\text{Na}$	45,43	3,79	13,25
2	310	43,51	4,08	16,69	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$	43,37	3,92	16,87
3	374	36,30	2,84	10,56	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BrN}_3\text{O}_6\text{Na}$	36,36	2,78	10,61
4	306	41,20	3,10	12,07	$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}_2$	41,03	3,13	11,97

5	338	40,87	2,63	11,14	$C_{13}H_{11}N_3O_8Na_2$	40,73	2,87	10,97
6	163	49,65	2,51	24,64	$C_7H_4N_3O_2Li$	49,70	2,37	24,85
7	163	45,48	2,24	22,63	$C_7H_4N_3O_2Na$	45,41	2,16	22,70
8	163	41,87	2,12	20,78	$C_7H_4N_3O_2K$	41,79	1,99	20,90
9	294	49,51	4,23	8,72	$C_{13}H_{13}N_2O_6Na$	49,37	4,11	8,86
10	309	47,04	4,28	12,74	$C_{13}H_{14}N_3O_6Na$	47,13	4,23	12,69
11	309	43,30	4,44	12,47	$C_{13}H_{14}N_3O_6Na$	47,13	4,23	12,69
12	329	44,55	3,60	8,12	$C_{13}H_{12}ClN_2O_6Na$	47,51	3,42	7,99
13	309	44,18	3,56	7,70	$C_{13}H_{12}N_2O_7Na_2$	44,07	3,39	7,91
14	177	52,60	3,12	23,13	$C_8H_6N_3O_2Li$	52,46	3,28	22,95
15	177	48,40	3,20	21,15	$C_8H_6N_3O_2Na$	48,24	3,02	21,11
16	177	44,80	2,87	19,37	$C_8H_6N_3O_2K$	44,65	2,79	19,53
17	177	43,24	2,01	12,46	$C_8H_4N_2O_3Na_2$	43,24	1,80	12,61
18	205	43,36	1,78	11,14	$C_9H_4N_2O_4Na_2$	43,20	1,60	11,20
19	296	41,70	3,52	17,80	$C_{11}H_{11}N_4O_6Na$	41,51	3,46	17,61
20	311	39,75	3,55	21,12	$C_{11}H_{12}N_5O_6Na$	39,64	3,60	21,02
21	311	39,50	3,60	21,14	$C_{11}H_{12}N_5O_6Na$	39,64	3,60	21,02
22	375	33,40	2,47	14,15	$C_{11}H_{10}BrN_4O_6Na$	33,25	2,52	14,11
23	311	37,20	2,75	15,84	$C_{11}H_{10}N_4O_7Na_2$	37,08	2,81	15,73
24	319	39,68	2,70	15,24	$C_{12}H_{10}N_4O_8Na_2$	39,56	2,75	15,38
25	164	42,47	1,59	33,07	$C_6H_3N_4O_2Li$	42,35	1,76	32,94
26	164	38,65	1,50	30,27	$C_6H_3N_4O_2Na$	38,71	1,61	30,11
27	243	25,70	0,80	19,84	$C_6H_2BrN_4O_2K$	25,62	0,71	19,93
28	179	35,71	2,07	34,68	$C_6H_4N_5O_2Na$	35,82	1,99	34,83
29	296	41,56	3,64	17,55	$C_{11}H_{11}N_4O_6Na$	41,51	3,46	17,61
30	311	39,74	3,48	21,20	$C_{11}H_{12}N_5O_6Na$	39,64	3,60	21,02
31	311	39,60	3,72	21,13	$C_{11}H_{12}N_5O_6Na$	39,64	3,60	21,02
32	375	33,20	2,70	14,10	$C_{11}H_{10}BrN_4O_6Na$	33,25	2,52	14,11
33	311	37,00	2,94	15,57	$C_{11}H_{10}N_4O_7Na_2$	37,08	2,81	15,73
34	319	39,60	2,67	15,50	$C_{12}H_{10}N_4O_8Na_2$	39,56	2,75	15,38
35	164	42,30	1,91	33,07	$C_6H_3N_4O_2Li$	42,35	1,76	32,94
36	179	35,70	2,12	34,90	$C_6H_4N_5O_2Na$	35,82	1,99	34,83
37	243	25,47	0,87	20,06	$C_6H_2BrN_4O_2K$	25,62	0,71	19,93

Синтезированные соединения представляют собой бесцветные или желтоватые кристаллические вещества с температурой плавления более 300°C.

Поставленная задача была также решена разработкой фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента циклические биоизостеры производных пуриновой системы согласно изобретению.

#### Краткое описание чертежей

В дальнейшем изобретение поясняется изложением результатов проведенных исследований биологической активности циклических биоизостеров производных пуриновой системы согласно изобретению, не ограничивающих их применение и не выходящих за объем формулы изобретения, и прилагаемыми чертежами, на которых:

Фиг.1a - калибровочные кривые зависимости интенсивностей флуоресцентности растворов флуоресцеина и клеток мыши NIH 3T3,

Фиг.1b - калибровочная кривая для определения  $pH_i$  в клетках мыши NIH 3T3,

Фиг.2 - зависимость  $pH_i$  клетки от pH среды,

Фиг.3 - изменение  $pH_i$  клетки при изменении pH среды с сывороткой крови после введения в среду соединений согласно изобретению,

Фиг.4- изменение  $pH_i$  клетки при изменении pH среды без сыворотки крови после введения в среду соединений согласно изобретению,

Фиг.5- изменение  $pH_i$  фибробластов в прикрепленном распластанном состоянии после введения в среду соединений согласно изобретению,

Фиг.6 - интенсивность хемилюминесценции  $I_H$  суспензии эритроцитов после инкубирования с соединениями согласно изобретению при 37°C и при 4°C,

Фиг.7a - интенсивность хемилюминесценции  $I_H$  суспензии эритроцитов после инкубирования с соединениями согласно изобретению в концентрациях  $10^{-11}$  –  $10^{-8}$ М,

Фиг.7b - интенсивность хемилюминесценции  $I_H$  суспензии эритроцитов после инкубирования с соединениями согласно изобретению и добавления аденозина,

Фиг.8 - интенсивность хемилюминесценции  $I_H$  клеток селезенки после инкубирования при 37°C и при 4°C с соединениями согласно изобретению,

Фиг.9 - влияние соединений согласно изобретению на активность супероксиддисмутазы,

Фиг.10- влияние соединений согласно изобретению на образование супероксид-анион радикалов в клетках,

Фиг.11- влияние соединений согласно изобретению на активность каталазы,



Фиг.12- влияние соединений согласно изобретению на активность пероксидазы эритроцитов,

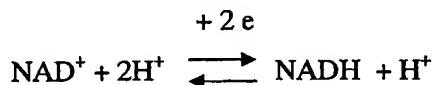
Фиг.13- влияние соединений согласно изобретению на активность NOC.

#### Описание изобретения

Из опубликованных ранее данных известно, что циклические гидразиды либо не подвергаются полярографическому восстановлению, либо восстанавливаются в достаточно жестких кислых или щелочных условиях при достаточно высоких потенциалах полувольты  $E_{1/2} > 1,0V$  (Seo E., Kuwana T. Polarography of cyclic Hydrazides, J. Electroanal.Chem., 1963, v.6, p. 417-418; Lund H. Polarographic and Electropreparative reduction of 1(2H)-phthalazinones, 2,3-dihydro-1,4 phthalazindiones and related compounds. Coll. Czechoslow. Chem.Com., 1965, v.30, p. 4237-4249).

Однако авторами было установлено, что соединения 1-37, согласно изобретению, являющиеся солями щелочных металлов циклических гидразидов, обладают способностью к электрохимическому восстановлению, причем при значениях потенциалов полувольты  $E_{1/2}$  от минус 0,09V до минус 0,2V.

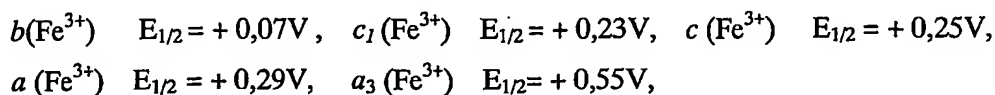
Для сравнения можно привести пример электрохимического восстановления кофермента  $NAD^+$ , осуществляемый при  $E_{1/2} = -0,32V$ , в котором в молекулу  $NAD^+$  включаются 2 электрона и один протон, а второй протон остается в среде:



Во флавиновых коферментах  $FAD^+$ , активной частью молекулы которого является изоаллоксазиновое кольцо, в результате восстановления при потенциале  $E_{1/2} = -0,05V$  чаще всего наблюдается присоединение двух протонов и двух электронов одновременно.

Восстановленные формы этих коферментов  $NADH$  и  $FADH$  транспортируют водород и электроны к дыхательной цепи митохондрий или иных энергосопрягающих мембран.

В дыхательной цепи митохондрий расположены цитохромы  $b$ ,  $c_I$ ,  $c$ ,  $a$  и  $a_3$  в порядке возрастания абсолютной величины их окислительно-восстановительного потенциала, установленного в условиях  $pH\ 7,0$ ,  $t = 25^\circ C$ :



играющие важную роль в процессе тканевого дыхания.

Цитохром *a* представляет собой терминальный участок дыхательной цепи – цитохромоксидазу, которая осуществляет окисление цитохрома *c* с образованием воды. Элементарный акт представляет собой двухэлектронное восстановление одного атома кислорода, при этом каждая молекула кислорода взаимодействует с двумя электротранспортными цепями. При транспорте каждой пары электронов во внутримитохондриальном пространстве может накапливаться до 6 протонов. Изменение соотношения количества протонов и электронов может приводить к нарушению процессов тканевого дыхания.

Авторами было установлено, что каждая молекула соединений 1-37 согласно изобретению способна проникать во внутриклеточное пространство и, обладая окислительно-восстановительным потенциалом, сравнимым с потенциалами электрохимического восстановления приведенных выше процессов, необратимо присоединять до 4 электронов и протонов, способствуя тем самым интенсификации процессов тканевого дыхания и значительному уменьшению метаболического внутриклеточного ацидоза.

#### **1. Электрохимическая активность соединений согласно изобретению.**

Были проведены исследования электрохимической активности соединений согласно изобретению.

Были исследованы водные растворы соединений 1, 5, 7, 10, 15, 18, 23, 25, 27, 33, 35, 36 согласно изобретению с исходной концентрацией  $1 \cdot 10^{-2}$  mol/l и, для сравнения, раствор препарата «димефосфон» в той же исходной концентрации.

Исследования проводили на универсальном полярографе ПУ-1 с двухкоординатным самописцем типа «ЛКД» с использованием трехэлектродной термостатируемой полярографической ячейки и ртутного капяющего электрода (РКЭ) с принудительным отрывом капли и периодом капания 0,5с. В качестве вспомогательного электрода использовали платиновую проволоку, в качестве электрода сравнения – насыщенный каломельный электрод (НКЭ).

В качестве фона использовали 2,0 %-ные растворы хлорида натрия, имеющие рН 7,0, 7,2, 7,4, 7,6 ; значения рН фонового раствора корректировали раствором гидроксида натрия. В полярографическую ячейку наливали 5,0 ml фонового раствора и в течение 5 минут продували азотом для удаления растворенного кислорода. Затем к фоновому раствору добавляли 0,5 ml раствора исследуемого вещества и производили запись полярограммы в виде волны восстановления. Концентрация соединений в полярографической ячейке составляла  $9 \cdot 10^{-4}$  М.

Измерение pH проводили на pH-метре с точностью плюс-минус 0,05 единиц pH. Полярографические измерения проводили при температуре 37°C. Запись полярограмм исследуемых соединений осуществляли в режиме постоянного тока со скоростью развертки потенциала 10,0 mV/s, прямой ход - от потенциала 0 до минус 0,5 V, обратный ход - от минус 0,5 V до 0. Чувствительность по току составляла 5,0 мкА. Масштаб по координате потенциалов - 50,0 mV/см. Значения потенциалов полувольт  $E_{1/2}$  исследуемых соединений приведены относительно потенциала НКЭ.

Параметры полярограммы - предельный ток  $i_{lim}$  и  $E_{1/2}$  определяли графическим методом. Число электронов, участвующих в реакции, рассчитывали на основании анализа волны восстановления по уравнению Гейровского-Ильковича.

Средние величины параметров волны восстановления исследуемых соединений при прямом ходе записи представлены в табл.2.

Таблица 2

Параметры полярограмм соединений

№ соединения	pH	7,0	7,2	7,4	7,6
1,5,7	$i$ , мкА	$0,26 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,01$
-«-	$-E_{1/2}$ , в	$0,11 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,03$	$0,105 \pm 0,01$	$0,105 \pm 0,02$
10, 15, 18	$i$ , мкА	$0,23 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,02$
-«-	$-E_{1/2}$ , в	$0,092 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,092 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$
23, 25, 27	$i$ , мкА	$0,32 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$
-«-	$-E_{1/2}$ , в	$0,16 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	$0,175 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,015$
33, 35,36	$i$ , мкА	$0,30 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$
-«-	$-E_{1/2}$ , в	$0,08 \pm 0,02$	$0,085 \pm 0,015$	$0,085 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,02$
Димефосфон	$i$ , мкА	$0,10 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02$
-«-	$-E_{1/2}$ , в	$0,175 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$

В процессе экспериментов было замечено, что, по сравнению со значениями кривых прямого хода, при записи полярограмм обратного хода значение потенциала полувольт было более положительно на 25,0 mV для соединений 1, 5, 7, на 30,0 mV - для соединений 10,15,18, на 20,0 mV - для соединений 23, 25, 27, на 27,0 mV - для соединений 33, 35, 26, и на 50,0mV - для препарата димефосфон.

Приведенные данные свидетельствуют о необратимости процесса электрохимического восстановления этих соединений.

Расчет числа электронов, участвующих в реакции восстановления, осуществляли по уравнению Гейровского-Ильковича :

$$E = E_{1/2} - \frac{2,3 RT}{nF} \lg \frac{i}{i_{lim} - i},$$

где  $n$  - число электронов,

$i$  - текущее значение тока волны,  $mkA$ ,

$i_{lim}$  - значение предельного тока волны,  $mkA$ ,

$F$ - число Фарадея, равное 96500К,

$R$ - универсальная газовая постоянная, равная 8,31 Джоуль /моль.К,

$T$ - температура, К,

$E, E_{1/2}$ - потенциалы, V .

В результате расчетов было установлено, что при восстановлении:

- для соединений 1,5,7 количество электронов составляет 3,72,
- для соединений 10,15,18 - 4,09,
- для соединений 23, 25, 27 - 3,72,
- для соединений 33, 35, 36 - 3,5,
- для димефосфона - 1,6,

то есть при восстановлении исследуемых соединений согласно изобретению потребляются 4 электрона, а при восстановлении димефосфона – 2 электрона, из чего можно сделать вывод, что соединения согласно изобретению проявляют большую, чем димефосфон, способность к необратимому присоединению электронов.

Были проведены исследования биологической активности соединений согласно изобретению.

## 2 . Влияние соединений согласно изобретению на $pH_i$ клетки.

Известны многие механизмы, обеспечивающие регуляцию  $pH_i$  , в том числе,  $Na^+/H^+$  обменники, локализованные в плазматической мембране, Na-зависимый и Na-независимый  $HCO_3^-/Cl^-$  обменники, обеспечивающие увеличение  $pH_i$  цитозоля клетки, а также  $Cl^-/HCO_3^-$  обменники, обеспечивающие понижение  $pH_i$  цитозоля, переносчики комплексов ионов  $Na^+$  с монокарбоксилатами, протонные помпы  $H^+$ - АТФ-азы, и другие (Ganz M.B.et all. Argininvasopression enchavces  $pH_i$  regulation in the presence of  $HCO_3^-$  by stimulating three acid- base transport systems, Nature,1989, v.337, p.648-651).

В связи со сходством биохимических механизмов различных типов клеток можно сделать заключение, что, если некий агент изменяет внутриклеточный  $pH_i$  в определенном типе клеток, то, в связи со сходством механизмов регуляции  $pH_i$ , этот же агент будет вызывать изменение  $pH_i$  и в других типах клеток. В частности, если соединения согласно изобретению вызывают изменение  $pH_i$  фибробластов, то они могут оказывать воздействие на  $pH_i$  макрофагов и нейтрофилов.

Известно, что активация макрофагов сопряжена с продуцированием и экстррузией протонов, с активацией систем транспорта протонов из клетки посредством протонных помп,  $Na^+/H^+$ -обменников, систем транспорта бикарбоната (Rogachev B., Hausmann M.J., Julzari R., Weiler H., Holmes C., Falct D., Chaimovitz C., Douvdevani A. Effect of bicarbonat-based dialysis solution on intracellular pH ( $pH_i$ ) and TNF-alpha production by peritoneal macrophages, *Perit. Dial. Int.*, 1997, Nov-Dec, 17(6), p.543-553; Bidani A., Heming T.A. Effect of concanavalin A on  $Na^+$ -depended and  $Na^+$ -independed mechanism for  $H^+$  extrusion in alveolar macrophages, *Lung.*, 1998, 176(1), p.25-31; Swallow C.J., Grinstein S., Sudsbury R.A., Rotstein O.D. Relative roles of  $Na^+/H^+$  exchange and vacuolar-type  $H^+$  ATPases in regulating cytoplasmic pH and Function in murine peritoneal macrophages, *J. Cell. Physiol.*, 1993, 157(3), p.453-460)

Например, активизация механизмов повышения  $pH_i$  цитозоля клетки, например,  $Na^+/H^+$ -антипортера, необходима для повышения активности нейтрофилов, в том числе, их микробицидной активности, так как снижение  $pH_i$  цитозоля блокирует функциональную активность нейтрофилов.

### **2.1. Влияние соединений согласно изобретению на $pH_i$ фибробластов.**

Было изучено влияние соединений согласно изобретению на внутриклеточный  $pH_i$  эмбриональных фибробластов мыши NIH-3T3, полученных из Всероссийской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. Клетки выращивали в среде ДМЕМ (Sigma), содержащей 2,2 г/л бикарбоната натрия с добавлением 80,0 мкг/мл гентамицина и 10,0% -ной эмбриональной телячьей сыворотки, при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5,0 % двуокиси углерода. Для опытов использовали также среду, забуференную 5,0 mM HEPES и 15,0 mM бикарбоната без сыворотки или с добавлением 5,0 % сыворотки. Подсчет клеток осуществляли с помощью гемоцитометра. Долю погибших клеток определяли по окраске трипановым синим.

Измерения внутриклеточного  $pH_i$  проводили с помощью красителей FDA (Sigma) и BCECF-AM (Calbiochem) на микроспектрофлуориметре по известной

методике (Кошевой Ю.В., Акатов В.С., Грובה М.Е. Микроспектрофлуориметр для измерения внутриклеточного pH (МИКрН). Приборы и оборудование для исследований в области физико-химической биологии и биотехнологии. Пущино, 1990, с.8-14).

Клетки при температуре 37°C окрашивали в течение 5 минут 5,0  $\mu$ M FDA, который непосредственно перед окраской готовили из 10,0 mM раствора в ацетоне путем разведения в течение 30 минут в фосфатном буфере до 0,1 mM, или 2,0  $\mu$ M 1,0 mM-ного раствора BCECF-AM в DMSO.

Использовали двухволновый метод определения pH<sub>i</sub> по отношению интенсивностей флуоресценции клеток на двух длинах волн (Акатов В.С и др. Внутриклеточный pH и субстратная зависимость пролиферации фибробластов китайского хомячка, Цитология, 1991, 33(7), с.86-94). Флуоресценцию возбуждали светом с  $\lambda = 490$  nm, эмиссию регистрировали одновременно с помощью двух фотоумножителей на длинах волн  $\lambda = 535$  nm,  $\lambda = 570$  nm. Определяли значение K – отношения флуоресценции на двух длинах волн с вычетом фоновой флуоресценции среды непосредственно вблизи исследуемых клеток, для 40-60 отдельных клеток, которое затем усредняли с определением ошибки измерения. Использовали термостатируемый столик, позволяющий вести измерения при температуре 37°C. Учитывали фотодинамическое повреждение окрашенных клеток при длительном непрерывном освещении возбуждающим светом. Показания снимали с участка препарата, экспонируемого не более 5 минут.

#### **Калибровка приборов**

Калибровочные кривые для определения абсолютных значений pH<sub>i</sub> по величине K строили по методике Thomas (Thomas J.A., Bushbaum R.N., Zimniak A., Racker E. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probe generated *in situ*, Biochemistry, 1979, v.18, p.2210-2218), для чего окрашенные клетки, обработанные в течение 5-10 минут карбоксикислотой нигерицином (Calbiochem) в концентрации 5-10  $\mu$ g/ml, помещали в раствор с высоким содержанием калия - 130 mM KCl, 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 20,0 mM HEPES) и значениями pH от 6,2 до 7,6. Измеряли значения K в средах с различным pH, полагая, что pH<sub>i</sub> клеток совпадает с pH среды вследствие действия нигерицина, который обменивает ионы калия на протоны и при высоком содержании калия в среде уравнивает значение pH среды и клеток. Для контроля стабильности показаний прибора использовали калибровочные кривые,

построенные по флуоресценции той же среды с добавлением 5,0 мкМ флуоресцеина или BCECF.

Корректность методики подтверждали в опытах по измерению значений  $pH_i$  клеток, обработанных протонофором моненсином, повышающим  $pH_i$  клеток за счет обмена ионов натрия на протоны, а также по установлению зависимости изменений  $pH_i$  от изменения  $pH$  среды. Величину  $pH$  среды ( $pH_o$ ) устанавливали в среде ДМЕМ без сыворотки, содержащей 5 mM HEPES и 15 mM бикарбоната, путем титрования HCl или КОН. Время инкубации клеток в среде с заданным значением  $pH$  составляло не менее 10 минут, что является достаточным временем для установления равновесия  $pH_i$  клеток с  $pH$  среды (Li J., Eastman A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T-lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification, J.Biol.Chem., 1995, v/270, p. 3203-3211).

На графике Фиг.1а представлены калибровочные зависимости величины  $K$  - отношения интенсивностей флуоресценции при 530 и 570 нм растворов флуоресцеина, имеющих  $pH$  в диапазоне 6,4-7,5 (кривая 1), и клеток мыши NIH 3T3, нагруженных FDA и помещенных в растворы, содержащие KCl, нигерицин и забуференные HEPES в диапазоне  $pH$  6,5-7,5 (кривая 2). Как видно из графиков, калибровочные зависимости для клеток NIH 3T3 смещены вправо на 0,1 единиц  $pH$  относительно калибровочных кривых растворов флуоресцеина. По ходу измерения влияния соединений согласно изобретению на  $pH_i$  контролировали постоянство калибровки прибора по растворам флуоресцеина, а пересчет значения  $K$  в  $pH_i$  для клеток, нагруженных FDA, осуществляли по кривой 2. В течение одного дня калибровка сохранялась с точностью плюс-минус 0,05 единиц  $pH$ , а в течение месяца работы - с точностью плюс-минус 0,1 единиц  $pH$ .

На графике Фиг.1b показана калибровка для клеток, нагруженных красителем BCECF-AM, помещенных в раствор с KCl, нигерицином и буфером HEPES ( $pH$  6,5-7,5). Эту калибровочную зависимость использовали для определения  $pH_i$  в клетках, нагруженных BCECF-AM. При этом использовали различные красители, поскольку известно, что при окрашивании FDA может показывать значения  $pH$  не только цитозоля, но и митохондрий, в то время как BCECF-AM является индикатором  $pH$ , в основном, цитозоля.

#### **2.1.1. Оценка зависимости $pH_i$ фибробластов от $pH$ внеклеточной среды.**

Для оценки возможного влияния соединений согласно изобретению на повышение  $pH_i$  клетки за счет повышения  $pH$  среды изучили зависимость  $pH_i$  фибробластов от  $pH$  среды.

Клетки окрашивали красителем BCECF-AM и измеряли  $pH_i$  после 10 минут инкубации в среде с соответствующим значением  $pH$ .

На графике Фиг.2 показана зависимость  $pH_i$  фибробластов мышей NIH 3T3 от  $pH$  среды. Результаты исследований показали, что в оптимальном для клеточных процессов физиологическом диапазоне  $pH$  среды от 6,9 - 7,0 до 7,4 - 7,5  $pH_i$  поддерживается на постоянном уровне. По мере уменьшения  $pH$  среды ниже 6,9  $pH_i$  падает, и при этом клетки не способны поддерживать уровень  $pH_i$  в оптимальном физиологическом диапазоне.

Также было установлено, что при  $pH$  среды выше оптимального физиологического диапазона величина  $pH_i$  не возрастает, а падает, что можно объяснить включением неких адаптационных механизмов клетки. И только при сублетальных для клеток значениях  $pH$  среды около 8,5 или более в клетке наблюдается подъем  $pH_i$  до оптимальных значений и выше ( $pH_i$  6,9-7,1).

Известно, что сыворотка крови содержит ростовые факторы, которые способны вызвать подъем  $pH_i$ . Для того, чтобы оценить состояние и возможности прибора, а также для сравнения с действием препарата, оценивали влияние сыворотки на величину  $pH_i$  фибробластов в суспензии. Для этого измеряли  $pH_i$  до добавления и через 20 мин после добавления 10 % сыворотки. Обнаружено, что после добавления сыворотки  $pH_i$  повышалось на 0,15 ед. По совокупности 11 опытов величина  $pH_i$  фибробластов в суспензии с сывороткой составляла  $6,94 \pm 0,01$  (12 измерений), а без сыворотки  $6,85 \pm 0,01$  (14 измерений). Измерения выполнялись с применением FDA и BCECF-AM.

Как известно,  $Na^+$ -ионофор моненсин вызывает усиленное поступление в клетки  $Na^+$  и выход протонов, что ведет к подъёму  $pH_i$ . Например, в клетках мышей NSO и NIH-3T3 введение 1-5  $\mu M$  моненсина в течение 15-20 минут вызывает повышение  $pH_i$  на 0,2 ед. (Соловьева М.Е., Акатов В.С., Лещенко В.В., Кудрявцев В.А. Механизм гибели клеток миеломы NS/O в культуре. Известия РАН, 1998,2,с.194-189), что хорошо согласуется с данными литературы (Zhu W.-H., Loh T.-T. Effects of  $Na^+/H^+$  antiport and intracellular  $pH$  in the regulation of HL-60 cell apoptosis, Biochim. Biophys. Acta, 1995, v.1269, p.122-128). При проверке этого результата было замечено, что



добавление в среду с сывороткой 10 мкМ моненсина вызывает подъем  $pH_i$  на 0,12 единиц  $pH$ .

Полученные результаты о влиянии сыворотки и моненсина на  $pH_i$  показывают достоверность показаний прибора и служат ориентиром для сравнения эффектов, вызываемых соединениями согласно изобретению.

#### **2.1.2. Исследования влияния соединений согласно изобретению на $pH_i$ фибробластов.**

На диаграмме Фиг.3 представлены результаты исследований изменения  $\Delta pH_i$  фибробластов NIH 3T3 в ростовой среде DME, содержащей 10,0 % сыворотки крови (область 1), через 20 мин после добавления в эту среду соединения из соединений 7, 15, 18, 23, 35, 36 в разных концентрациях: 0,02 мкг/мл (область 3), 0,2 мкг/мл (область 4), 2,0 мкг/мл (область 5), 20,0 мкг/мл (область 6), слева направо, соответственно, величины  $\Delta pH_i$  при введении в среду соединений 7, 15, 18, 23, 35, 36, и, для сравнения, - при введении в среду 10 мкМ моненсина (область 2).

Установлено, что соединения согласно изобретению в концентрации 0,02 мкг/мл не вызывали повышения  $pH_i$ . При концентрации соединений 20,0 мкг/мл возрастание составляло в среднем 0,05 ед.  $pH$ , но не было достоверно отлично от нуля из-за большого разброса результатов. При концентрации 0,2 и 2,0 мкг/мл соединения вызывали достоверное увеличение  $pH_i$  цитозоля клетки в среднем на 0,10 и 0,12 единиц  $pH$ , соответственно, аналогичное тому, которое наблюдали при добавлении сыворотки или моненсина.

На диаграмме Фиг.4 показаны результаты исследований изменения  $pH_i$  клеток через 20 мин после добавления тех же соединений в концентрациях 0,02 мкг/мл (область 1 диаграммы), 0,2 мкг/мл (область 2), 2,0 мкг/мл (область 3), 20,0 мкг/мл (область 4), 200 мкг/мл (область 5) и 1000 мкг/мл (область 6), соответственно, слева направо, при введении соединения 7, 15, 18, 23, 35, 36 к среде DME без сыворотки крови, при отсутствии растворимых в среде ростовых факторов, цитокинов. В этих условиях исследуемые соединения в концентрации 2,0 и 20,0 мкг/мл достоверно повышали  $pH_i$ , в среднем, на 0,08 единиц  $pH$ , и не было обнаружено достоверного влияния на  $pH_i$  соединений согласно изобретению при концентрации 0,02, 0,2, 200 и 1000 мкг/мл.

На диаграмме Фиг.5 показаны результаты исследований влияния введения в среду соединений согласно изобретению в концентрациях 2,0 мкг/мл (область 2) и 20,0 мкг/мл (область 3) на  $pH_i$  фибробластов в прикрепленном распластанном состоянии, в

области 2 и 3 слева направо изменение, соответственно, для соединений 7, 15, 18, 23, 35, 36, и, для сравнения, - влияние введения 10,0 мкМ моненсина (область 1). Это исследование было выполнено потому, что в условиях *in vivo* фибробласты обычно прикрепляются и распластываются на элементах тканевого матрикса. Оказалось, что в этом случае исследуемые соединения в концентрациях 2,0 и 20,0 мкг/мл также вызывают достоверный подъем рН<sub>i</sub> в среднем на 0,10 и 0,07 единиц рН, аналогично тому, который наблюдается под действием моненсина.

#### Выводы

Полученные результаты показывают, что в среде с сывороткой крови, в присутствии ростовых факторов и цитокинов, соединения 7, 15, 18, 23, 35, 36 согласно изобретению вызывают достоверное увеличение рН<sub>i</sub> цитозоля эмбриональных фибробластов мышей линии NIH 3T3: в концентрациях 0,2 мкг/мл - в среднем на 0,1 единицы рН, а в концентрациях 2,0 мкг/мл - в среднем на 0,12 единиц рН, и не инициируют изменения рН<sub>i</sub> при концентрации 0,02 и 20,0 мкг/мл. Величина подъема рН<sub>i</sub>, вызванная введением соединений согласно изобретению, сравнима с той, которая наблюдается при действии ростовых факторов сыворотки крови или ионофора моненсина - известного агента, вызывающего увеличение рН<sub>i</sub> цитозоля.

В среде без сыворотки крови соединения согласно изобретению в концентрации 2,0 мкг/мл и в концентрации 20,0 мкг/мл достоверно повышали рН<sub>i</sub> фибробластов мыши линии NIH 3T3 в среднем на 0,08 единиц рН, и не было обнаружено достоверного влияния на рН<sub>i</sub> соединений согласно изобретению в концентрациях 0,02, 0,20, 200 и 1000 мкг/мл.

Соединения согласно изобретению в концентрации 2,0 мкг/мл и в концентрации 20,0 мкг/мл достоверно индуцировали увеличение рН<sub>i</sub> цитозоля прикрепленных в внеклеточному матриксу фибробластов мыши линии NIH 3T3 в среднем на 0,08 единиц рН.

Все соединения согласно изобретению в концентрации, по меньшей мере, до 2,0 мкг/мл, не вызывали изменения рН среды с сывороткой крови, и их влияние на рН<sub>i</sub> фибробластов не связано с изменением ими рН среды.

Добавление соединений согласно изобретению в концентрации до 2,0 мкг/мл в среду с 10,0 % сыворотки при исходном рН среды 7,2 ± 0,1 не вызывало повышения рН среды при измерении с точностью до 0,03 ед. рН.

Таким образом, показано, что соединения согласно изобретению в концентрациях 0,2, 2,0, 20 мкг/мл вызывают повышение рН<sub>i</sub> цитозоля фибробластов

как в прикрепленном состоянии, так и в суспензии, независимо от наличия в среде ростовых факторов и цитокинов сыворотки крови. Величина подъема pH, вызванная этими соединениями, сравнима с той величиной, которая наблюдается при действии ростовых факторов сыворотки или ионофора моненсина - известного агента повышения pH цитоплазмы.

### **3. Взаимодействие соединений согласно изобретению с аденозинчувствительными рецепторами.**

При сопоставительном анализе химической структуры соединений согласно изобретению - производных бензо[d]пиридазиндиона, пиридо[2,3-d]пиридазиндиона, пиазино[2,3-d]пиридазиндиона и пиримидо[4,5-d]пиридазиндиона - были сделаны предположения о циклическом изостеризме этих соединений и других производных пуриновой системы – аденина, гуанина, гипоксантина. Анализ их структуры позволяет сделать вывод о том, что все перечисленные производные являются конденсированными гетероциклическими соединениями, имеющими сходное распределение электронной плотности. Модели Стюарта-Бриглеба и описанные выше реакции рибозилирования соединений согласно изобретению убедительно доказывают, что  $\beta$ -d-рибофуранозный фрагмент может присоединяться к атому азота пиридазиндионного фрагмента любого из перечисленных гетероциклов. Полученные сведения позволили предположить, что соединения согласно изобретению могут обладать и сходной с производными пуриновой системы биологической активностью, в частности, обладать изотропностью к аденозинчувствительным рецепторам, а имеющиеся отличия в структуре и распределении  $\pi$ -электронного облака молекул позволяют предполагать наличие дополнительной биологической активности, которой не обладают производные пуриновой системы - аденин, гуанин, гипоксантин.

#### **3.1. Взаимодействие соединений согласно изобретению с аденозинчувствительными рецепторами тромбоцитов.**

Одним из примеров, подтверждающих вероятную схожесть структуры соединений согласно изобретению со структурой аденозина, является уменьшение агрегации тромбоцитов.

В настоящее время в качестве средств, угнетающих агрегацию тромбоцитов и улучшающих микроциркуляцию, известно незначительное количество лекарственных препаратов, например, ацетилсалициловая кислота, дипиридамол, индобуфен, пентоксифиллин, клопидогрел и тиклопидин. При этом эффективность их не во всех случаях применения бывает достаточно высокой, а использование их сопровождается

побочными проявлениями из-за их ulcerогенности, гепатотоксичности, аллергизирующих свойств и других нежелательных эффектов.

Были проведены исследования воздействия соединений согласно изобретению на агрегацию тромбоцитов, индуцированную предварительным введением раствора индуктора агрегации, при конкурирующем введении соединений согласно изобретению.

Агрегация тромбоцитов изучалась методом Борна, в основе которого лежит определение изменений оптической плотности плазмы, обогащенной тромбоцитами, после ее инкубации с индуктором агрегации.

В качестве индуктора агрегации была выбрана аденозиндифосфорная кислота (ADP), признанная эндогенным фактором агрегации. Использовали образец (регистрационный номер 885) фирмы Sigma Diagnostics (USA) в конечной концентрации  $10^{-5}$  M.

ADP, высвобождаясь из тромбоцитов на начальных этапах клеточного гемостаза, инициирует образование необратимого конгломерата кровяных пластинок и является одним из интеграторов различных путей увеличения количества тромбоцитарных агрегатов: фосфоинозитольный путь, освобождение кальция, циклических мононуклеотидов, активация кальмодулина, и других путей.

Эксперименты были выполнены на кроликах-самцах породы «Шиншилла» массой  $2,7 \pm 0,3$  kg. Накануне за 18-24 часа до опыта их лишали корма, сохраняя свободный доступ к воде.

Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, из надреза краевой вены уха кролика забирали кровь, стабилизировали ее 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1, и центрифугировали при 200g (1000 об/мин) в течение 10 минут. Верхний надосадочный слой, обогащенный тромбоцитами, переносили автоматической пипеткой в силиконовую пробирку и хранили при 37° C. Плазма, богатая тромбоцитами, содержала, в среднем,  $3 \times 10^8$  кровяных пластинок в 1,0 l. Если оно было больше указанного  $3 \times 10^8$  кровяных пластинок в 1л, данную пробу разводили до нужной концентрации плазмой, лишенной тромбоцитов, которую получали центрифугированием крови при 650g в течение 10 минут.

Замеры оптической плотности образцов проводили на двухканальном агрегометре фирмы "Chrono-log" (США). Кювету, куда вносили 490 мкл плазмы, богатой тромбоцитами, помещали в прибор, опускали в нее магнитную мешалку, покрытую тефлоном. Регистрировали показатель максимальной амплитуды агрегации

МА, выраженный в процентах падения оптической плотности плазмы под влиянием индуктора агрегации. Показатель МА плазмы, являющейся контролем, сравнивали с МА плазмы, инкубированной в течение 3-х минут с различными концентрациями соединений : от  $10^{-3}$  до  $10^{-7}$  в опытах *in vitro* или плазмы, полученной через 15,30, 60 и 120 минут после внутривенного введения различных доз соединений в опытах *in vivo*.

Процесс агрегации тромбоцитов регистрировали с помощью компьютера, при этом на экране монитора были представлены кривые, отражающие изменения оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы, которую принимали за эталон 100%, по сравнению с оптической плотностью бестромбоцитарной плазмы, принятой за 0% содержания тромбоцитов.

### 3.1.1. Исследования *in vitro*.

В условиях *in vitro* в кювету с обогащённой тромбоцитами плазмой крови сначала вводили индуктор агрегации ADP в концентрации  $10^{-5}$  М, инкубировали в течение 3 минут, затем добавляли непосредственно в кювету соединения согласно изобретению. Их действие на агрегацию тромбоцитов изучали после 3-х- минутного инкубирования при широком диапазоне концентраций от  $10^{-3}$  до  $10^{-7}$  М, вплоть до минимальной концентрации  $10^{-7}$  М, не вызывающей эффекта подавления агрегации. Результаты исследований приведены в табл.3.

Таблица 3

Влияние соединений согласно изобретению на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов кроликов в условиях *in vitro*

Соединение	МА - падение оптической плотности плазмы, % к эталону, при концентрации соединений					
	$10^{-3}$ М		$10^{-4}$ М		$10^{-5}$ М	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
2	60,8 ± 3,4	51,4 ± 2,7*	60,0 ± 2,1	50,4 ± 1,7*	52,5 ± 2,1	48,2 ± 1,0*
4	-«-	49,2 ± 2,3*	-«-	50,2 ± 2,0*	-«-	46,2 ± 3,1*
6	-«-	50,0 ± 1,9*	-«-	53,3 ± 2,2*	-«-	47,4 ± 2,0*
9	-«-	47,3 ± 2,0*	-«-	53,1 ± 1,8 *	-«-	41,4 ± 3,4*
10	-«-	46,2 ± 2,7*	-«-	48,7 ± 2,4*	-«-	40,2 ± 4,0*
15	-«-	44,8 ± 2,8*	-«-	46,3 ± 1,7*	-«-	39,8 ± 3,1*
21	-«-	47,1 ± 3,0*	-«-	49,2 ± 2,1*	-«-	41,8 ± 2,4*
25	-«-	48,2 ± 2,9*	-«-	48,6 ± 2,0*	-«-	43,4 ± 3,2*

28	-«-	49,7 ± 2,2*	-«-	48,9 ± 2,4*	-«-	44,2 ± 2,7*
31	-«-	44,9 ± 2,3*	-«-	46,7 ± 2,2*	-«-	39,9 ± 2,1*
36	-«-	45,8 ± 2,3*	-«-	46,9 ± 2,4*	-«-	40,1 ± 2,0*
37	-«-	46,9 ± 2,7*	-«-	47,1 ± 2,0*	-«-	40,6 ± 1,7*

Продолжение табл.3

Соединение	МА – падение оптической плотности, % к эталону, при концентрации соединений			
	10 <sup>-6</sup> М		10 <sup>-7</sup> М	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
2	52,8 ± 1,8	50,1 ± 2,0	51,5 ± 2,1	50,8 ± 2,2
4	-«-	50,6 ± 3,1	-«-	49,9 ± 3,4
6	-«-	51,2 ± 3,2	-«-	50,7 ± 3,2
9	-«-	49,4 ± 3,2	-«-	51,2 ± 1,7
10	-«-	48,4 ± 2,4	-«-	49,8 ± 2,0
15	-«-	47,3 ± 1,8*	-«-	49,3 ± 1,4
21	-«-	49,6 ± 1,7	-«-	49,7 ± 2,1
25	-«-	50,3 ± 2,1	-«-	50,1 ± 3,0
28	-«-	50,9 ± 2,7	-«-	50,4 ± 3,0
31	-«-	47,5 ± 1,7*	-«-	49,5 ± 1,2
36	-«-	49,3 ± 2,6	-«-	49,7 ± 1,8
37	-«-	48,1 ± 2,9	-«-	50,1 ± 1,0

Примечание: \*достоверно при p ≤ 0,05

Из данных табл.3 видно, что на модели ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов введение соединений согласно изобретению в концентрации 10<sup>-3</sup>М вызывает падение оптической плотности плазмы в диапазоне от 5,4% до 36,5% по сравнению с контролем. При введении соединений в концентрации 10<sup>-4</sup>М эффект составляет от 4,0 % до 29,2 %. При введении в плазму, обогащенную тромбоцитами, соединений согласно изобретению в концентрации 10<sup>-5</sup>М также было замечено угнетение агрегационной функции кровяных пластинок, падение оптической плотности составило от 2,3% до 34,1% по сравнению с контролем. Таким образом, в диапазоне концентраций 10<sup>-3</sup>М, 10<sup>-4</sup>М, 10<sup>-5</sup>М исследуемые соединения согласно изобретению проявляли примерно одинаковую степень подавления агрегации..

Более низкая концентрация соединений  $10^{-6}$ М снижала агрегацию уже в значительно меньшем диапазоне – от 3,4% до 17,2%. В концентрации  $10^{-7}$  М действие соединений прекращалось.

Полученные *in vitro* данные свидетельствуют о высокой антиагрегационной способности соединений согласно изобретению в диапазоне концентраций от  $10^{-3}$ М до  $10^{-5}$ М.

### 3.1.2. Исследования *in vivo*.

Была исследована антиагрегационная способность соединений 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в опытах *in vivo*. Животным вводили внутривенно индуктор агрегации ADP в концентрации  $10^{-5}$  М и затем соединения согласно изобретению. В эксперименте были использованы дозы соединений в диапазоне от 15 до 60 mg/kg. Эти дозы были выбраны с учетом наиболее эффективных концентраций от  $10^{-3}$ М до  $10^{-5}$  М, полученных в опытах *in vitro*, и обусловлены морфо-функциональными особенностями организма кролика, такими, как скорость биотрансформации лекарств, соотношение размеров печени и всего организма, интенсивность фильтрационной способности почек и другими.

Для нивелирования различий силы действия соединений в разные дни, возможно, обусловленных изменениями температуры окружающей среды, влажности и других параметров, ежедневно брали в опыт по 2 животных каждой серии. Под серией понимается группа из 6 животных, на которых изучается одна из доз вещества.

Кровь для получения плазмы, богатой тромбоцитами, брали из краевой вены уха: в контрольной группе - непосредственно перед введением исследуемых соединений, в исследуемых группах - через 15 минут после введения исследуемых соединений и затем через 30, 60, 120 минут и так далее, вплоть до того момента, когда эффект подавления агрегации исчезал.

До опыта и в конце его в каждом образце плазмы подсчитывали количество тромбоцитов.. Результаты исследований представлены в табл.4.

Таблица 4

Влияние соединений согласно изобретению на ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов кроликов ( МА- падение оптической плотности, % к эталону)

МА, % контроль	Сое- дине- ние	Доза, mg/kg	МА, %, через 15 мин	МА, %, через 30 мин	МА, %, через 60 мин	МА, %, через 120 мин

50,1± 1,7	2	15,0	44,2 ± 2,0*	42,2 ± 1,6*	46,9 ± 1,7*	49,2 ± 2,0
-«-	15		42,8 ± 1,8*	41,8 ± 1,5*	45,6 ± 1,5*	48,3 ± 2,3*
-«-	21		43,5 ± 1,7*	43,3 ± 1,7*	46,7 ± 1,5*	49,1 ± 1,7
«-	37		42,9 ± 1,6*	41,9 ± 1,6*	45,9 ± 1,6	48,7 ± 2,1
61,0± 1,3	2	30,0	45,3 ± 2,0*	43,7 ± 1,7*	40,1 ± 2,2*	59,7 ± 2,2
-«-	15		43,2 ± 2,2*	41,8 ± 1,9*	37,8 ± 1,8*	58,1 ± 1,7
-«-	21		46,7 ± 1,9*	45,4 ± 1,8*	45,0 ± 1,9	60,3 ± 2,1
-«-	37		43,5 ± 2,0*	42,0 ± 1,4*	41,6 ± 1,4*	58,4 ± 1,7
48,6± 1,3	2	60,0	45,2 ± 1,2*	43,6 ± 2,0*	47,8 ± 1,5	48,0 ± 1,2
-«-	15		43,1 ± 1,5*	41,3 ± 1,5*	44,7 ± 0,8	47,2 ± 1,6
-«-	21		45,1 ± 0,9*	43,2 ± 2,0*	47,3 ± 1,6	48,3 ± 1,5
-«-	37		43,4 ± 1,8*	42,4 ± 0,7*	46,2 ± 2,0	47,3 ± 1,7

Примечание: \* достоверно при  $p \leq 0,05$

Из данных табл. 4 видно, что соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в дозе 30 mg/kg уже через 15 минут после введения подавляли агрегацию тромбоцитов: уменьшение значений падения оптической плотности МА составило от 17,5% до 34,9% по сравнению с контролем. Этот эффект сохранялся на достигнутом уровне еще 15 минут, а затем несколько усиливался к 60 минуте от начала опыта. Восстановление первоначального значения МА регистрировалось к концу наблюдения по истечении 120 минут.

При увеличении дозы до 60 mg/kg была отмечена аналогичная картина, хотя способность тромбоцитов к склеиванию (МА) была снижена до диапазона 1,7% - 17,5% по сравнению с контролем. Эффект снижения агрегации через 30 минут опыта сохранялся в диапазоне 3,5% - 20,1% и исчезал к 120 минуте наблюдения.

Доза 15 mg/kg уменьшала эффект воздействия индуктора агрегации в диапазоне от 6,8% до 23% в первые 30 минут эксперимента. Эффект снижения агрегации исчезал к 120 минуте опыта.

#### Выводы

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что соединения согласно изобретению при внутривенном введении в дозах 15, 30, 60 mg/kg обладают выраженным антиагрегационным эффектом, продолжительность которого составляет около 2 часов.



### 3.2. Взаимодействие соединений согласно изобретению с аденозинчувствительными рецепторами эритроцитов.

Были проведены исследования взаимодействия соединений 2,15, 21, 37 согласно изобретению с аденозинчувствительными рецепторами эритроцитов мышей линии BALB/c, самок возраста 8-12 месяцев.

Была определена зависимость интенсивности хемилюминесценции соединений согласно изобретению в щелочной среде – растворе 0,1N-ном NaOH в присутствии перекиси водорода, являющейся инициатором процесса хемилюминесценции. Хемилюминесцентные исследования проводили на хемилюминометре «ЛКБ».

Эритроциты периферической крови мышей сначала трижды отмывали физиологическим раствором при центрифугировании и затем разводили в растворе Хенкса без глюкозы 10 объемами дистиллированной воды и использовали в опыт немедленно.

На первой стадии опытов отмывтые эритроциты инкубировали при температуре 37°C или при 4°C с растворами соединений согласно изобретению в концентрации от  $10^{-7}$  до  $10^{-5}$ М в течение 5 – 30 минут, затем отмывали физиологическим раствором двукратным центрифугированием на холоду. Полученную суспензию эритроцитов со связанными с ними соединениями согласно изобретению помещали в 0,1N- раствор NaOH с добавлением перекиси водорода в конечной концентрации  $10^{-7}$ М. Проводили измерения интенсивности хемилюминесценции. Контролем служила суспензия эритроцитов без введения соединений согласно изобретению.

Результаты опытов представлены на диаграмме Фиг.6, где показаны величины интенсивности хемилюминесценции  $I_H$  в течение 3 минут суспензии эритроцитов: в контроле ( линии «к») при температуре инкубирования 37°C (непрерывные линии на диаграмме) и 4°C (пунктирные линии на диаграмме) и то же в опытах после инкубирования с исследуемыми соединениями ( слева направо для соединений 2, 15, 21, 37), при 37°C( непрерывные линии) и при 4°C ( пунктирные линии) в концентрации  $K_i$  от  $10^{-7}$  М,  $10^{-6}$ М и  $10^{-5}$ М. Результаты показывают, что связывание соединений согласно изобретению с эритроцитами периферической крови мышей не зависит от температуры, что, согласно известным данным, соответствует условиям рецепторного связывания.

На второй стадии опытов отмывтые эритроциты инкубировали при температуре 37°C с растворами соединений согласно изобретению в концентрации от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$ М в течение 5 – 30 минут, затем отмывали физиологическим раствором двукратным

центрифугированием на холоду, в полученную суспензию добавляли раствор аденозина в концентрации  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  и инкубировали в течение 15 минут, затем отмывали физиологическим раствором двукратным центрифугированием на холоду. Полученную суспензию эритроцитов со связанными с ними соединениями согласно изобретению помещали в 0,1N- раствор NaOH с добавлением перекиси водорода в конечной концентрации  $10^{-7}$ М. Проводили измерения интенсивности хемилюминесценции. Результаты опытов представлены на Фиг. 7а и 7б.

На диаграмме Фиг.7а показана величина интенсивности хемилюминесценции  $I_H$  в течение 3 минут в контроле (область 0) и после инкубирования эритроцитов с соединениями 2, 15, 21, 37 согласно изобретению (на диаграмме, соответственно, в областях слева направо) при 37°C при концентрации соединений от  $10^{-11}$ М до  $10^{-8}$ М.

На диаграмме Фиг.7б показана величина интенсивности хемилюминесценции  $I_H$  в течение 3 минут после инкубирования эритроцитов с соединениями 2, 15, 21, 37 (слева направо в областях) при температуре 37°C (область 0) и с добавлением аденозина в концентрации  $10^{-6}$ М,  $10^{-5}$ М и  $10^{-4}$ М.

Как видно из полученных данных, аденозин в концентрациях  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$ М снижает связывание соединений согласно изобретению с эритроцитами в 1,5 раза, что может быть результатом конкурентного связывания с рецепторами одного вида.

### **Выводы**

Таким образом, было показано, что соединения согласно изобретению проявляют изотропность к аденозиновым рецепторам, находящимся как на тромбоцитах, так и на эритроцитах.

### **3.3. Взаимодействие соединений согласно изобретению с ядродержащими клетками.**

Были исследованы особенности взаимодействия соединений согласно изобретению с ядродержащими клетками на примере клеток селезенки мышей линии BALB/c возрастом 8-12 месяцев.

Клетки селезенки очищали центрифугированием в градиенте плотности фиколла, отмывали центрифугированием и суспендировали в растворе Хенкса. Затем клетки селезенки инкубировали с соединениями 6, 15, 25, 37 в конечной концентрации  $10^{-5}$ М в течение 30 минут при температуре 37°C или 4°C, затем дважды отмывали центрифугированием на холоде. Затем проводили хемилюминесцентные исследования на хемилюминометре «ЛКБ» аналогично описанным выше.

Полученные результаты представлены на диаграмме Фиг.8, где в области 1 показана интенсивность хемилюминесценции  $I_H$  клеток селезенки, инкубированных при температуре 37°C без исследуемых соединений (контроль, значение первое слева) и клеток селезенки, инкубированных с соединениями согласно изобретению (слева направо начиная со второго значения, соответственно, для соединений 6,15,25 и 37), а в области 2 показана интенсивность хемилюминесценции для аналогичных групп клеток и в аналогичном порядке, инкубированных при 4°C.

Из диаграммы Фиг.8 можно сделать заключение, что в ядродержащих клетках селезенки после введения соединений согласно изобретению при температуре 37°C уровень свечения значительно выше, чем при 4°C, что свидетельствует о проникновении этих соединений через клеточную мембрану в цитозоль клетки и связывании их с аденозинчувствительными рецепторами, находящимися внутри клетки.

#### **Заключение**

Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что соединения согласно изобретению являются биологическими изостерами производных пуриновой системы, в частности, аденозина. Обладая сходной с аденином реакционной способностью присоединять  $\beta$ -D-рибофуранозный фрагмент и аналогичной аденозину химической структурой, соединения согласно изобретению способны взаимодействовать с аденозинчувствительными рецепторами, находящимися на мембранах неядерных клеток, а также проникать через клеточные мембраны ядродержащих клеток. Эти свойства соединений согласно изобретению обуславливают возможность их влияния на аденозинзависимые ферменты, с выполнением функций, присущих, например, никотинамидным коферментам – никотинамидадениндинуклеотиду  $NAD^+$  и его фосфорилированным производным  $NADPh^+$  или флавинзависимым коферментам  $FAD^+$ , являющимися важными биологическим переносчиками атомов водорода.

#### **4. Влияние соединений согласно изобретению на гемостаз.**

Известно, что нормально функционирующая система гемостаза должна обеспечивать сохранность жидкого состояния крови в пределах сосудов, что обеспечивается мощной противосвертывающей системой крови, и быстрое тромбообразование поврежденных участков для предотвращения кровопотери и кровоизлияния в ткани, что обеспечивается системой свертывания крови, в

образовании и формировании которых участвуют ряд факторов плазмы крови, тромбоцитов и тканей.

Считается, что в организме существуют специфические ингибиторы для каждого фактора свертывания крови. Снижение активности этих ингибиторов повышает свертываемость крови и способствует образованию тромбов. Повышение активности этих ингибиторов затрудняет свертываемость крови и может сопровождаться развитием геморрагий.

Были проведены исследования соединений согласно изобретению по их влиянию на факторы плазмы крови, в частности, на состояние плазменного гемостаза.

Исследования были выполнены на 72 кроликах породы "Шиншилла" массой  $2,5 \pm 0,3$  kg, которым внутривенно были введены растворы соединений 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в дозах 15, 30 и 60 mg/kg. В опытах были использованы тромбин-тест (серия № 7300) и коагуло-тест (серия № 5000), приобретенные на НПО "Ренам", тромбопластин (серия № 240600) и хлорид кальция, приобретенные на "НПО МедиоЛаб".

Статические параметры свертывания крови и плазмы - частичное активированное тромбопластиновое время, тромбиновое время, максимальная свертывающая активность (тест автокоагуляции) - определяли на коагулометре Behnk Electronic (Германия). Принцип работы данного прибора основан на том, что образовавшийся сгусток размыкает контакт счетчика импульсов в цепи кювета - шифт, последний постоянно колеблется в вертикальной плоскости. Момент образования сгустка регистрируют остановкой стрелки секундомера.

Измерение осуществляли при постоянной температуре 37°C, поддерживаемой блоком термостатирования.

#### **4.1. Влияние на частичное активированное тромбопластиновое время (АЧТВ).**

АЧТВ является стандартизированной коагуляционной пробой, чувствительной к дефициту всех плазменных факторов (кроме VII), отражает состояние начального этапа внутреннего механизма коагуляции и показывает наличие в крови веществ, обладающих антикоагулянтными свойствами, например, как у гепарина.

Опытным животным (описаны выше) внутривенно вводили соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в концентрации 15, 30 и 60 mg/kg и затем отбирали кровь по истечении 15, 30, 60 и 120 минут после введения.

Образцы плазмы крови, лишенной тромбоцитов, полученных, как описано выше, в количестве 0,1 ml вносили в кювету коагулометра и прогревали в течение 1

мин при 37°C, затем добавляли 0,1 ml 0,277%-ного раствора хлорида кальция и регистрировали время свертывания крови. Сравнивали время свертывания T, в секундах, контрольной плазмы и плазмы, полученной после внутривенного введения через 15, 30, 60 и 120 минут. Результаты измерений приведены в табл.5.

Таблица 5

Влияние соединений согласно изобретению на показатели АЧТВ кроликов при внутривенном введении

T, s контроль	Соединение	Доза, mg/kg	T, s через 15 мин.	T, s через 30 мин.	T, s через 60 мин.	T, s через 120 мин.
37,0 ± 0,2	2	15,0	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,2	36,9 ± 0,1	37,0 ± 0,3
-«-	15	-«-	37,0 ± 0,1	37,0 ± 0,2	36,9 ± 0,1	37,0 ± 0,3
-«-	21	-«-	37,1 ± 0,1	37,2 ± 0,1	36,9 ± 0,1	37,0 ± 0,2
-«-	37	-«-	37,0 ± 0,2	37,1 ± 0,1	37,0 ± 0,2	36,9 ± 0,1
33,3 ± 0,8	2	30,0	32,7 ± 0,5	32,0 ± 0,1	32,2 ± 0,1	32,1 ± 0,2
-«-	15	-«-	32,9 ± 0,8	32,1 ± 0,1	32,0 ± 0,2	32,0 ± 0,1
-«-	21	-«-	32,8 ± 0,4	32,0 ± 0,1	32,2 ± 0,1	32,1 ± 0,1
-«-	37	-«-	33,1 ± 0,1	33,3 ± 0,1	33,3 ± 0,2	33,0 ± 0,4
32,5 ± 0,3	2	60,0	32,3 ± 0,2	32,4 ± 0,1	32,3 ± 0,1	32,4 ± 0,1
-«-	15	-«-	32,2 ± 0,1	32,2 ± 0,1	32,1 ± 0,2	32,2 ± 0,1
-«-	21	-«-	32,0 ± 0,4	32,1 ± 0,2	32,0 ± 0,1	32,3 ± 0,2
-«-	37	-«-	32,5 ± 0,1	32,3 ± 0,2	32,4 ± 0,1	32,6 ± 0,3

Из данных табл.5 видно, что в проведенных исследованиях соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в дозах 15,0, 30,0, 60,0 mg/kg не приводят к изменению АЧТВ.

#### 4.2. Влияние на протромбиновое время.

"Протромбиновое время" является одним из важнейших показателей состояния гемостаза, который постоянно используется в экспериментальной и клинической медицине.

Метод его определения основан на оценке свертывания цитратной или оксалазной плазмы крови при смешивании ее с тромбопластином и раствором хлорида кальция. Поскольку в этих условиях время образования сгустка зависит от содержания II, VII, IX, X факторов в исследуемом образце плазмы, в настоящее время тест

называется "тромбопластиновое время по Квику" или "активность тромбопластинового комплекса".

Опытным животным (описаны выше) внутривенно вводили соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в концентрации 15, 30 и 60 mg/kg и затем отбирали кровь по истечении 15, 30, 60 и 120 минут после введения.

Цитратную кровь, содержащую 1 часть цитрата на 9 частей нативной крови, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для получения плазмы, лишенной тромбоцитов.

В пробирку, находящуюся в водяной бане, вводили 0,1 ml плазмы и 0,1 ml раствора тромбопластина. Спустя 60 секунд добавляли 0,1 ml 0,277%-ного раствора кальция хлорида и фиксировали время реакции  $T_1$  в секундах. Результаты исследований приведены в табл.6.

Таблица 6

Влияние соединений согласно изобретению на показатели протромбинового времени кроликов при внутривенном введении

$T_1$ , s контроль	Сое- ди- не- ние	Доза, mg/kg	$T_1$ , s через 15 мин.	$T_1$ , s через 30 мин.	$T_1$ , s через 60 мин.	$T_1$ , s через 120 мин.
$11,8 \pm 0,1$	2	15,0	$11,7 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,2$	$11,4 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,1$
-«-	15	-«-	$11,5 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,2$
-«-	21	-«-	$11,4 \pm 0,2$	$11,5 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,2$
-«-	37	-«-	$11,6 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,2$	$11,8 \pm 0,1$
$11,2 \pm 0,1$	2	30,0	$11,1 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,2$
-«-	15	-«-	$11,0 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,2$	$11,4 \pm 0,2$	$11,3 \pm 0,2$
-«-	21	-«-	$11,2 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,1$	$11,3 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,2$
-«-	37	-«-	$11,3 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,2$	$11,4 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,1$
$12,0 \pm 0,1$	2	60,0	$12,0 \pm 0,1$	$11,9 \pm 0,2$	$12,1 \pm 0,2$	$11,9 \pm 0,1$
-«-	15	-«-	$12,0 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,1$
-«-	21	-«-	$12,0 \pm 0,2$	$11,8 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,2$
-«-	37	-«-	$12,1 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,2$	$12,0 \pm 0,1$

Из данных табл.6 видно, что в проведенных исследованиях соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в дозах 15,0, 30,0, 60,0 mg/kg не оказывают влияния на показатель протромбинового времени.

#### 4.3. Влияние на показатели аутокоагуляционного теста.

Данный параметр отражает динамику нарастания, а затем инактивации тромбопластин-тромбиновой активности исследуемой крови.

Опытным животным (описаны выше) внутривенно вводили соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в концентрации 15, 30 и 60 mg/kg и затем отбирали кровь по истечении 15, 30, 60 и 120 минут после введения.

В 0,2 ml плазмы, полученной центрифугированием цитратной крови при 1500 об/мин в течение 10 минут, вносили гликолизат-кальцевую смесь (2,0ml 0,222%-ного  $\text{CaCl}_2$  + 0,1ml исследуемой цитратной крови) через 4, 6, 8, 10 минут с момента приготовления этой смеси и определяли время свертывания в образце.

Полученные результаты, в секундах, по специальной таблице переводили в показатели свертывающей активности А, в %, которые свидетельствуют о состоянии как прокоагулянтного, так и антикоагулянтного звеньев свертывающей системы крови. Результаты опытов приведены в табл. 7.

Таблица 7

Влияние соединений согласно изобретению на значения свертывающей активности А по данным аутокоагуляционного теста кроликов при внутривенном введении

А, % контроль	Сое- ди- не- ние	Доза, mg/kg	А, % через 15 мин.	А, % через 30 мин.	А, % через 60 мин.	А, % через 120 мин.
85,6	2	15,0	80,2	100,0	87,4	98,0
-«-	15	-«-	82,3	103,0	89,0	101,2
-«-	21	-«-	81,4	101,3	86,5	97,4
-«-	37	-«-	82,1	102,8	88,7	100,6
70,0	2	30,0	98,4	71,2	104,2	70,9
-«-	15	-«-	100,3	68,4	106,6	70,6
-«-	21	-«-	97,2	69,1	103,7	71,0
-«-	37	-«-	99,8	68,3	105,8	70,4

65,9	2	60,0	72,3	60,8	62,5	65,7
-«-	15	-«-	74,4	63,2	64,4	66,5
-«-	21	-«-	71,9	62,1	63,7	66,2
-«-	37	-«-	74,3	63,0	64,2	66,3

Из данных табл.7 видно, что в проведенных исследованиях соединения 2, 15, 21, 37 согласно изобретению в дозах 15,0, 30,0, 60,0 mg/kg не оказывали влияния на показатель свертывающей активности по аутокоагуляционному тесту.

#### 4.4. Влияние на тромбиновое время

"Тромбиновое время" характеризует скорость превращения фибриногена в фибрин. Его определяли измерением времени свертывания лишенной тромбоцитов плазмы под влиянием стандартизованного на контрольной плазме тромбина.

К 0,2 ml исследуемой плазмы крови опытных животных, у которых кровь забирали через 15, 30, 60 и 120 минут после введения внутривенно соединений 2,15,21, 37 согласно изобретению в дозах 15, 30, 60 mg/kg, инкубированной в течение 1 минуты при температуре 37°C, добавляли 0,2 ml раствора тромбина и на коагулометре Behnk Electronic (Германия) регистрировали время образования сгустка  $T_2$  в секундах. Результаты исследований представлены в табл.8.

Таблица 8

Влияние соединений согласно изобретению на тромбиновое время плазмы кроликов при внутривенном введении

$T_2$ , s контроль	Сое- ди- не- ние	Доза, mg/kg	$T_2$ , s через 15 мин.	$T_2$ , s через 30 мин.	$T_2$ , s через 60 мин.	$T_2$ , s через 120 мин.
15,8	2	15,0	16,2*	17,0*	16,0*	15,3*
-«-	15	-«-	17,0*	18,5*	16,5*	15,5*
-«-	21	-«-	16,4*	17,7*	16,1*	15,7*
-«-	37	-«-	16,9*	18,2*	16,3*	15,6*
14,7	2	30,0	17,8*	18,4*	19,2*	15,3*
-«-	15	-«-	19,7*	20,5*	21,3*	15,0*
-«-	21	-«-	17,9*	18,8*	19,0*	15,6*
-«-	37	-«-	19,5*	20,3*	21,0*	15,2*



15,2	2	60,0	16,0*	16,9*	15,9*	15,3*
	15	-«-	16,8*	18,0*	16,5*	14,7*
	21	-«-	16,2*	17,7*	16,3*	15,7*
	37	-«-	16,6*	17,8*	16,2*	15,0*

Примечание: \* - достоверно по сравнению с контролем, при  $p \leq 0,05$ .

Из приведенных в табл.8 данных видно, что в дозе 15,0 mg/kg введение соединений согласно изобретению увеличивало тромбиновое время к 15 минуте наблюдения, этот эффект достигал максимума к 30 минуте, ослабевал в течение следующего получаса и полностью исчезал к 120 минуте. Аналогичные результаты были получены и при введении соединений в дозе 60,0 mg/kg. Влияние соединений на этот показатель гемостаза несколько усиливалось только при дозе 30,0 mg/kg: время свертывания крови постепенно увеличивалось в течение первых 25 минут опыта, достигало максимума к 60 минуте, а затем нормализовалось к 120 минуте эксперимента.

#### **Выводы**

Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения согласно изобретению не оказывают патологического воздействия на нормально функционирующую систему гемостаза.

#### **5. Влияние соединений согласно изобретению на процессы продуцирования и связывания активных форм кислорода.**

Представляло большой интерес изучение влияния соединений согласно изобретению на активность трех важнейших ферментов окислительной системы организма: каталазы, пероксидазы и супероксидсмутазы. Эти ферменты доступны для определения в крови человека и животных и отражают три различных уровня инактивации активных форм кислорода - перекиси водорода, супероксидных радикалов и промежуточных форм их обмена.

Свободное окисление протекает при участии свободнорадикальных форм кислорода, которые образуются в процессе одноэлектронного восстановления кислорода и, прежде всего, супероксид-анион радикала кислорода  $O_2^-$ . Этот радикал может образовываться и при изменении условий функционирования дыхательной цепи, и под влиянием ультрафиолетовых лучей, а также при взаимодействия кислорода с ионами металлов переменной валентности, чаще всего – с железом  $Fe^{2+}$  и может продуцироваться в клетках ферментами, такими, как ксантиноксидаза или NADPH –

оксидаза. Он является высокореакционным соединением, которое, вследствие высокой гидрофильности не может покидать клетку и накапливается в цитозоле клетки.

Живые клетки имеют системы защиты от повышенного продуцирования свободных радикалов. Фермент супероксиддисмутаза SOD превращает супероксид-анион радикал кислорода в менее реакционноспособный и более гидрофобный пероксид водорода  $H_2O_2$ . Пероксид водорода является субстратом для каталазы и глутатионзависимых пероксидаз, которые катализируют его превращение в молекулы воды. Усиленное генерирование свободных радикалов сопровождается патологические состояния, например, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, а также процессы биологического старения. Однако, полное подавление процесса перекисных процессов в тканях нецелесообразно, так как свободные радикалы обладают полезными свойствами. Они индуцируют апоптоз, участвуют в формировании клеточного иммунитета, регулируют жирнокислотный состав липидных молекул в клеточной мембране.

Известно, что циклические гидразиды ароматических и гетероциклических орто-дикарбоновых кислот способны взаимодействовать с активными формами кислорода, в частности, супероксид-анионами, гидроксильными радикалами и гидроперекисными радикалами  $HO_2^{\cdot}$ , что характеризуется явлением хемилюминесценции указанных циклических гидразидов (Brenton P.D. Mechanistic Aspect of Diazaquinone Chemiluminescence. Aust. J. Chem., 1984, v.37, p. 1001-1008).

Авторами изобретения были проведены исследования возможности соединений согласно изобретению, обладающих, как было показано выше, способностью проникать через клеточную мембрану, связывать избыточно продуцируемые супероксид-анионы кислорода.

#### **5.1. Влияние соединений согласно изобретению на активность SOD связывания супероксид-анион радикалов.**

Были проведены исследования влияние соединений согласно изобретению на активность связывания супероксид-анионов кислорода супероксиддисмутазой SOD.

Принцип метода основан на конкуренции SOD или соединений согласно изобретению с нитросиним тетразолием (TTNB) за супероксид-анионы, образующиеся при аэробной реакции NAD-H и фенозинметасульфата (FMS). Известно, что в присутствии SOD восстановление TTNB снижается. В случае взаимодействия соединений согласно изобретению с супероксид-анион радикалами, восстановление TTNB также будет снижаться ( Nishikimi M., Rao N.A. and Yagi K. The occurrence of

superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun, 1972, v.46, p. 849-855).

Процесс можно представить следующей схемой:

- 1)  $\text{NAD-H} + \text{FMS} \rightarrow \text{супероксид-анион радикал} + \text{NAD}^+ + \text{FMS восстановленный}$
- 2)  $\text{SOD} + \text{супероксид-анион радикал} \rightarrow \text{инактивированный супероксид}$   
(или соединения  
согласно изобретению)  
или  $\text{TTNB} + \text{супероксид-анион радикал} \rightarrow \text{TTNB восстановленный}$

Интенсивность генерации и перехвата супероксид-анион радикала регистрировали при 560 нм по степени блокирования супероксиддисмутазой или исследуемыми соединениями реакции восстановления TTNB. При этом активность SOD или исследуемых соединений согласно изобретению оценивали, принимая за единицу активности 50%-ное ингибирование образования TTNB восстановленного. Активность SOD в зависимости от влияния соединений согласно изобретению выражали в единицах в минуту в пересчете на 1 mg лизата эритроцитов.

Эритроциты мышей линии BALB/c, самок возрастом 3 месяца, отмывали при центрифугировании и лизировали 10 объемами дистиллированной воды. Гемолизат затем инкубировали в течение 30 минут при 37°C с соединениями 3, 15, 23, 37 согласно изобретению в различных концентрациях, мкМ: 10,0; 50,0; 100,0, и измеряли активность SOD.

Результаты исследований представлены на графиках Фиг.9, где кривые 1,2,3,4 показывают активность SOD  $A_{\text{SOD}}$  после инкубирования, соответственно, с соединениями 3, 15, 23, 37.

Из графиков Фиг.9 видно, что присутствие соединений согласно изобретению дозозависимо ингибирует активность SOD, что объясняется конкурентным связыванием супероксид-анион радикалов соединениями согласно изобретению.

## 5.2. Влияние на продуцирование супероксид-анион радикалов.

Были проведены исследования возможного влияния соединений 3,15,23,37 согласно изобретению в концентрациях 10, 50, 100 мкМ на образование супероксид-анион радикалов в реакции  $\text{NAD-H} + \text{FMS} + \text{TTNB}$ . Влияние оценивали по изменению оптической плотности растворов при образовании TTNB восстановленного.

Использовали НСТ в конечной концентрации 0,7 mM, FMS – 33 мкМ, NAD-H – 70 мкМ и исследуемые соединения в различных концентрациях в растворе Хенкса. Реакционную массу инкубировали 10 минут при температуре 37°C. Изменение светопропускной способности С реакционной смеси фиксировали на

спектрофотометре при 560 нм и оценивали в процентах относительно принятой за эталон светопропускной способности в модели реакции  $\text{NAD-H} + \text{FMS} + \text{TTNB}$  с использованием вместо соединений согласно изобретению SOD эритроцитов 98% чистоты (рекомбинантная человеческая SOD). Результаты испытаний приведены на графиках Фиг.10, где кривые 1, 2, 3, 4 показывают влияние соединений, соответственно, 3, 15, 23, 37 на активность SOD.

Из графиков Фиг.10 видно, что исследуемые соединения дозозависимо связывают образующиеся супероксид-анион радикалы.

### **5. 3. Влияние соединений согласно изобретению на активность каталазы и пероксидазы.**

В основе методов определения активности каталазы лежит количественное определение скорости процесса разложения перекиси водорода, которая является специфическим субстратом для этого фермента. Были проведены исследования процессов конкурентного взаимодействия соединений 3, 15, 23, 36 согласно изобретению с перекисью водорода.

Для определения активности каталазы авторы изобретения использовали метод спектрофотометрической регистрации продуктов, образующихся в процессе взаимодействия перекиси водорода с молибдатом аммония. Это реакция быстропротекающая и специфичная, в результате которой образуются устойчивые продукты.

К 0,1 ml гомолизированных эритроцитов крови мышей линии BALB/c добавляли 2,0 ml 0,03%-ного раствора перекиси водорода (эталон), или готовили такую же смесь с добавлением одного из соединений 3, 15, 23, 36 согласно изобретению в концентрациях 1,0 или 10,0 mkg/ml (опыт), а затем в разных опытах через 10, 20, 30, 60, 90, 120 минут добавляли 1,0 ml 4%-ного раствора молибдата аммония. Реакция сопровождается быстрым и необратимым разложением перекиси водорода и образованием цветных продуктов. Светопоглощение полученных растворов измеряли при 410 nm, толщина кюветы 1,0 см, в контрольной кювете использовали дистиллированную воду.

Результаты исследований представлены на графиках Фиг. 11, активность каталазы показана в относительных величинах  $A_k$ . Кривые 1, 2, 3, 4 отражают влияние, соответственно, соединений 3, 15, 23, 36 в концентрации 1,0 mkg/ml на активность каталазы в течение времени  $t$  эксперимента. Для концентрации 10,0 mkg/ml зависимость аналогичная (на графике не показано).

Определение активности пероксидазы представляет значительный интерес в клинической практике. Для ее определения использовали метод, основанный на окислении индигокармина в слабокислой среде.

К 2,0 ml ацетатного буферного раствора добавляли 0,1 ml осадка гомолизованных эритроцитов крови мышей линии BALB/c, добавляли 2,0 ml 0,03%-ного раствора перекиси водорода (контроль), или готовили такую же смесь с добавлением соединений 3, 15, 23, 36 согласно изобретению в концентрациях 1,0 или 10,0 mkg/ml (опыт), а затем в разных опытах через 10, 20, 30, 60, 90, 120 минут добавляли 1,0 ml индигокармина. Отмечали время реакции с индигокармином в секундах по изменению перехода окраски раствора из синей через зеленую в бесцветную, затем в розовую. В опытах время окончания реакции отмечали при переходе цвета окраски в бесцветную.

Полученные результаты представлены в относительных величинах  $A_p$  на графиках Фиг.12, кривые 1,2,3,4 для соединений, соответственно, 3, 15, 23, 36 согласно изобретению в концентрации 1,0 mkg/ml, для концентрации 10,0 mkg/ml (на графиках не показано) прослеживается аналогичная зависимость.

### **Выводы**

Таким образом, соединения согласно изобретению оказывают выраженное влияние на активность важнейших ферментов окислительной системы организма - каталазы, пероксидазы и супероксидсмутазы, при этом влияние на кинетику ферментов носит колебательный характер с ограниченной амплитудой, что указывает на регулирующий характер воздействия соединений согласно изобретению и перевод ферментов в режим активной адаптации к новым условиям. Кроме того, определена способность соединений согласно изобретению взаимодействовать с избыточно продуцируемыми в клетке активными формами кислорода.

### **6. Влияние соединений согласно изобретению на развитие окислительного стресса.**

Известно, что в условиях окислительного стресса, вызванного избыточным образованием в клетках активных форм кислорода или реакционно активных метаболитов азота в клетке изменяются многие биохимические показатели крови и нарушаются нитрергические механизмы клеток.

В качестве модели создания окислительного стресса в клетках была выбрана модель морфиновой абстиненции у крыс, являющаяся аналогом героиновой абстиненции человека.

Физическую зависимость от морфина моделировали на самцах-крысах Wistar массой 250-350 грамм возраста 6 месяцев инъектированием внутривенно морфина гидрохлоридом в течение 6 дней 2 раза в сутки ( в 10<sup>00</sup> часов и 20<sup>00</sup> часов) в дозах с возрастанием по схеме, mg/kg: 10, 10; 20, 20; 40, 40; 60, 60; 80, 80; 100, 100 (Rahman S., Ali Khan R., Kumar A. Experimental study of the morphine deaddiction properties of Delphinium denudatum Wall//BMC Complement Altern. Med. 2002, v.29, p. 1-6; Dum J., Blasig J., Herz A. Buprenorphine: demonstration of physical dependence liability. Eur. J. Pharmacol., 1981, v. 70, p. 293-300).

В экспериментах были поставлены опыты на крысах в сериях по 7 животных на каждое соединение согласно изобретению. Контрольной группой служили неморфинизированные животные, без введения соединений согласно изобретению. Первую опытную группу составляли животные, морфинизированные по вышеуказанной методике, вторую группу – животные, которым вводили только соединения 6, 15, 25, 37 согласно изобретению внутримышечно в дозе 20,0 mg/kg три раза в течение суток, третью - морфинизированные животные, которым трижды в течение суток, следующих после последней дозы морфина, вводили соединения 6, 15, 25, 37 согласно изобретению внутримышечно в дозе 20,0 mg/kg. Затем крыс декапитировали, кровь из сонных артерий собирали в пробирки с раствором EDTA в качестве антикоагулянта, центрифугировали при 1500g в течение 15 минут при 4°C.

#### **6.1. Влияние соединений согласно изобретению на активность ферментов в плазме крови**

Для оценки возможного гепатопротекторного действия соединений согласно изобретению в условиях развития окислительного стресса в клетках печени, было исследовано влияние соединений согласно изобретению на важнейшие биохимические показатели крови, в частности, на содержание в плазме крови индикаторных ферментов аспартатаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT),  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы ( $\gamma$ -GTP). Содержание ферментов оценивали по их катализирующей активности в плазме крови.

Известно, что морфиновая абстиненция приводит к повышению активности ферментов AST и  $\gamma$ -GTP в плазме крови, что свидетельствует о токсическом действии морфина на печень животных.

Активность AST, ALT и  $\gamma$ -GTP определяли с помощью диагностических наборов DiaSys, Germany. Результаты испытаний представлены в табл.9.

**Влияние морфина и соединений согласно изобретению на содержание  $C_i$   
индикаторных ферментов в плазме крови**

Фермент	$C_i$ , мЕ/л контроль	$C_i$ , мЕ/л контроль+ морфин,	Соединение	$C_i$ , мЕ/л контроль + соединение	$C_i$ , мЕ/л контроль+ морфин + соединение
ALT	106,76 ± 11,35	116,12 ± 10,44	6	114,5 ± 1,13	122,44 ± 2,01
	-«-		15	113,48 ± 2,39	121,08 ± 5,04
	-«-		25	115,27 ± 1,09	121,96 ± 3,4
	-«-		37	113,84 ± 2,0	120,84 ± 5,20
AST	179,88 ± 11,94	238,20 ± 14,71	6	176,18 ± 3,26	198,34 ± 9,32
			15	173,46 ± 5,63	195,57 ± 18,68
			25	177,34 ± 6,13	196,46 ± 15,34
			37	174,82 ± 4,91	193,58 ± 14,18
γ-GTP	6,26 ± 1,80	16,80 ± 3,32	6	8,27 ± 2,12	12,52 ± 2,02
			15	7,03 ± 2,82	10,69 ± 1,84
			25	7,57 ± 1,93	11,37 ± 1,54
			37	8,14 ± 2,64	10,32 ± 2,67

Из данных табл.9 видно, что при введении только соединений согласно изобретению активность ферментов AST и γ-GTP не изменялась и соответствовала показателям контрольной группы. Введение морфина приводило к повышению активности указанных ферментов в крови, что свидетельствует о нарушении деятельности печени, а последующее введение соединений согласно изобретению приводило к нормализации деятельности печени и устранению последствий воздействия морфина на клетки печени крыс.

#### **6.2. Влияние соединений согласно изобретению на внутриклеточные метаболические процессы**

Для оценки интенсивности метаболизма оксида азота у крыс проводили количественное определение стабильных метаболитов оксида азота – нитритов и нитратов  $NO_x^-$  в плазме крови, супернатантах печени и тимуса спектрометрическим методом, а также в супернатантах мозга – флюорометрическим методом

В основе спектрометрического метода лежит взаимодействие нитритов с реактивом Грисса (смесь 2%-ного раствора сульфаниламида и 0,2%-ного N-(1-нафтил)этилендиамина. На первом этапе нитрит реагирует с сульфаниламидом с образованием соли диазония, а затем в результате реакции со вторым компонентом образуется азокраситель с максимумом адсорбции при 540 nm. Для восстановления нитратов в нитриты ферментативным способом применяли бактериальную нитрат редуктазу (Grisham M.B. et al., 1995). Депротеинизированные при 100°C в течение 5 минут образцы плазмы и супернатанта печени инкубировали в течение 30 минут при 37°C в 50,0 mM HEPES pH 7,4 в присутствии 0,2 unit /ml *Aspergillus* нитрат редуктазы, 5,0 mkM FAD и 0,1 mM NAD-Ph. В конце реакции добавляли лактатдегидрогеназу и пируват для удаления NAD-Ph, мешающего реакции Грисса. Затем добавляли реактив Грисса и после 10 минутной инкубации измеряли светопоглощение образцов при 540 nm. Для расчета количества  $\text{NO}_x^-$  применяли нитрат натрия в качестве стандарта.

В основе флюорометрического метода лежит определение уровня нитритов по интенсивности флюоресценции 2,3-диаминонафтотриазола, продукта реакции 2,3-диаминонафталина (DAN) и нитрита в кислой среде ( Misko T.R., Schilling R.J., Salvemini D. et al. A fluorometric assay for the measurement of nitrite of biological samples. Anal. Biochem., 1993, v. 214, p. 11-16). Депротеинизированные при 100°C супернатанты мозга помещали в нитрит-регенерирующую систему, содержащую 0,125 unit/ml нитратредуктазы, 25 mkM NADPh и 25 mkM FAD, приготовленных в 20 mM Трис-HCl буфере pH 7,6, и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Для окисления NADPh использовали систему лактатдегидрогеназа /пируват. Затем добавляли 316 mkM раствора DAN в 0,62 M соляной кислоты и инкубировали 10 минут в темноте. Для стабилизации флюоресценции образовавшегося 2,3- диаминонафтотриазола добавляли 280 mM NaOH. Интенсивность флюоресценции измеряли на спектрофлюориметре Hitachi F-3000 при длине волны возбуждения 365 nm и эмиссии 405 nm. Для расчета концентрации  $\text{NO}_x^-$  в мозге был использован стандартный раствор нитрата натрия.

Было также изучено влияние соединений 6, 15, 25, 37 согласно изобретению на активность изоформ синтазы оксида азота (NOC), в частности, на активность  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой изоформ NOC в печени морфинизированных крыс радиометрическим методом по скорости накопления L-цитруллина в реакции окисления [ $^3\text{H}$ ]L-аргинина, катализируемой NOC (Bredt and Snyder. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad.



Sci. USA, 1989, v. 86, p. 9030-9033). Образование L-цитруллина в этой реакции эквивалентно биосинтезу оксида азота.

Реакцию инициировали добавлением супернатанта печени, мозга или тимуса в реакционную среду, содержащую 2,0 мкКу/мл [ $^3\text{H}$ ]L-аргинина, 20 mM HEPES pH 7,4, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5,0 мкМ FAD, 5,0 мкМ FMN, 1,0 mM NADPh, 50,0 мкМ  $\text{BH}_4$  при исследовании супернатантов мозга, а при анализе супернатантов печени для ингибирования аргиназы и рециклизации [ $^3\text{H}$ ]L-цитруллина в [ $^3\text{H}$ ]L-аргинин в среду дополнительно вводили 50,0 mM L-валина и 1,0 mM L-цитруллина. После 15-60 минут инкубации при 37°C в образцы добавляли суспензию Dowex 50WX8-400 ( $\text{Na}^+$ -форма), которая сорбирует непрореагировавший L-аргинин, но не L-цитруллин. После сорбции активность образцов определяли на сцинтилляционном счетчике SL-4000 "Intertechne". Активность  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой изоформ NOC определяли по разнице скоростей образования [ $^3\text{H}$ ]L-цитруллина в трех параллельных образцах, содержащих 2,0 mM EDTA в качестве хелатора  $\text{Ca}^{2+}$  и в качестве ингибитора всех форм NOC - 2,0 mM EDTA + 2,0 mM L-NAME, и без ингибиторов. Активность фермента NOC в исследуемом супернатанте считали в pmol [ $^3\text{H}$ ]L-цитруллина, накопленного за единицу времени на 1 mg белка в супернатанте.

Результаты испытаний приведены в табл.10 и на Фиг. 13.

Таблица 10

Влияние морфина и соединений согласно изобретению на уровень нитритов в плазме крови и супернатантах печени и мозга и активность синтазы оксида азота (NOC) в мозге

Показатель	Контроль	Контроль+ морфин	Соединение	Контроль+ соединение	Контроль+ морфин + соединение
Нитриты в плазме крови, мкмол/мл	18,30 ± 2,14	12,12 ± 0,61	6	15,83 ± 1,21	15,86 ± 1,20
			15	14,39 ± 0,84	13,91 ± 1,91
			25	17,10 ± 2,05	16,78 ± 2,11
			37	16,13 ± 1,80	15,33 ± 0,87
Нитриты в печени,	0,260 ± 0,023	0,259 ± 0,012	6	0,245 ± 0,010	0,294 ± 0,02
			15	0,259 ± 0,019	0,285 ± 0,02

nmol/mg белка			25	0,307 ± 0,012	0,287±0,01
			37	0,262 ± 0,018	0,274±0,01
Нитриты в мозге, nmol/mg белка:					
Кора больших полушарий	4,63 ± 0,29	5,31 ± 0,29	6	4,59 ± 0,44	5,12 ± 0,18
			15	4,31 ± 0,37	4,72 ± 0,37
			25	4,47 ± 0,43	4,91 ± 0,32
			37	4,36 ± 0,24	4,77 ± 0,28
Средний мозг	5,66 ± 0,19	9,41 ± 1,20	6	7,01 ± 0,82	5,76 ± 0,94
			15	6,65 ± 0,70	5,50 ± 0,43
			25	6,98 ± 1,02	5,91 ± 0,74
			37	6,84 ± 0,56	5,63 ± 0,37
Гипоталамус	6,57 ± 0,50	4,62 ± 0,71	6	6,94 ± 0,67	6,72 ± 0,94
			15	6,77 ± 0,83	6,57 ± 0,88
			25	6,87 ± 0,80	6,67 ± 0,79
			37	6,79 ± 0,92	6,52 ± 0,83
Активность NOC, pmol/min/mg белка:					
Средний мозг	2,18 ± 0,09	3,08 ± 0,09	6	2,84 ± 0,31	1,99 ± 0,31
			15	2,60 ± 0,29	1,83 ± 0,23
			25	2,65 ± 0,43	1,97 ± 0,27
			37	2,62 ± 0,27	1,85 ± 0,30
Гипоталамус	5,37 ± 0,20	3,42 ± 0,54	6	5,93 ± 0,27	5,34 ± 0,24
			15	5,45 ± 0,24	5,26 ± 0,28
			25	5,88 ± 0,27	5,23 ± 0,27
			37	5,61 ± 0,22	5,59 ± 0,22

Из приведенных в табл.10 уровней содержания нитритов в крови видно, что морфин достоверно снижал высвобождение в кровь нитритов (при  $p \leq 0,02$ ), такое снижение уровня нитритов в крови может свидетельствовать об уменьшении генерации оксида азота в органах или сосудах при морфиновой абстиненции. Соединения согласно изобретению предотвращали этот эффект, что может

свидетельствовать о влиянии этих соединений на активность синтазы оксида азота в тканях или на активность соответствующего фермента в эндотелии сосудов.

В печени (табл.10) соединения согласно изобретению предотвращали накопление продуктов перекисного окисления.

В мозге (табл.10) введение животным морфина оказывало специфическое влияние на накопление нитритов и активность NOC: в гипоталамусе – снижение, а в коре больших полушарий и среднем мозге - повышение нитрергических показателей. При введении только соединений согласно изобретению в коре больших полушарий наблюдалось снижение нитрергических показателей, а в среднем мозге и в гипоталамусе – их повышение. Последующее введение соединений согласно изобретению восстанавливало нарушенную морфином активность NOC в гипоталамусе, среднем мозге, коре больших полушарий.

На диаграмме Фиг.13 показана активность NOC общая (область 1 диаграммы), активность кальций-зависимой NOC (область 2) и активность кальций-независимой NOC (область 3) в контроле (значение к), при введении морфина (значение м), при введении только соединений 6, 15, 23, 37 (группа С), и при введении соединений согласно изобретению после введения морфина (группа D), соответственно, слева направо в областях 1, 2, 3, 4.

Результаты исследований позволяют сделать заключение, что в печени активность изоформ NOC достоверно изменялась под действием морфина. По сравнению с контролем общая активность NOC у морфинизированных крыс и крыс, получивших только соединения согласно изобретению, не изменялась. Однако введение морфина вызывало повышение активности кальций-зависимой формы NOC и снижение активности кальций-независимой формы NOC. А введение соединений согласно изобретению морфинизированным животным приводило к нормализации активности кальций-зависимой NOC и к увеличению активности кальций-независимой NOC выше исходного уровня, что приводило к повышению общей активности фермента NOC.

Было также исследовано влияние соединений согласно изобретению на состояние тимуса крыс: контрольная группа, опытная группа морфинизированных животных, опытная группа животных, инъецированных соединениями согласно изобретению и опытная группа животных, морфинизированных и затем инъецированных соединениями согласно изобретению. Эксперимент проводили аналогично описанному выше. Результаты представлены в табл. 11.

Таблица 11.

Влияние морфина и соединений согласно изобретению на состояние тимуса

Показатель	Контроль	Введение морфина	Соединение	Введение соединения	Введение морфина и соединения
Масса тимуса, mg	$230 \pm 14$	$145 \pm 9$	6	$242 \pm 17$	$207 \pm 14$
			15	$298 \pm 25$	$214 \pm 12$
			25	$254 \pm 14$	$218 \pm 17$
			37	$263 \pm 21$	$228 \pm 15$
Нитриты, nmol/mg белка супернатанта	$0,331 \pm 0,041$	$0,511 \pm 0,05$	6	$0,424 \pm 0,04$	$0,419 \pm 0,02$
			15	$0,407 \pm 0,02$	$0,383 \pm 0,02$
			25	$0,417 \pm 0,02$	$0,396 \pm 0,02$
			37	$0,410 \pm 0,01$	$0,387 \pm 0,01$

Из данных, приведенных в табл. 11 видно, что морфиновая абстиненция вызывает инволюцию тимуса, а соединения согласно изобретению полностью предотвращают этот эффект морфина. Кроме того, соединения согласно изобретению предотвращают накопление нитритов в тимусе.

#### Выводы

Таким образом, можно сделать вывод, что соединения согласно изобретению обладают гепатопротекторным действием: предотвращают повышение активности ферментов AST и  $\gamma$ -GTP и купируют окислительный стресс в печени.

Кроме того, соединения согласно изобретению предотвращают инволюцию тимуса, оказывают влияние на различные изоформы синтазы оксида азота, осуществляя коррекцию нарушенных нитригергических механизмов в печени, отделах мозга и тимусе.

#### 7. Оценка общетоксического действия соединений согласно изобретению.

Общетоксическое действие соединений согласно изобретению было изучено в хроническом эксперименте на крысах при введении крысам соединений в форме свечей, содержащих в качестве активного ингредиента соединения согласно изобретению: 5 % активного ингредиента в свечной основе, полученной сплавом на водяной бане Витепсола марок Н-15 и W-35 в равных количествах.

Опыты проводили на инбредных крысах. Животных для эксперимента подбирали в группу методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя, по 24 самца или 24 самки на один препарат из исследуемых в одной дозе соединений 2, 15, 23, 34, 37. За 4-5 часов до ректального введения препарата животных лишали корма, манипуляции с животными приводили к рефлекторному акту дефекации, освобождавшей полость прямой кишки.

В экспериментах использовали две дозы препаратов – 50 mg/kg и 500 mg/kg. Свечи перед введением размягчали разогревом на водяной бане в стеклянном стакане при температуре 38-39°C, набирали в туберкулиновый шприц объемом 1 мл, присоединяли к шприцу иглу с оливой и вводили свечную массу в прямую кишку животным на глубину 1,5-2,0 см. Животным контрольной группы вводили стерильное медицинское вазелиновое масло в объеме, соответствующем объему исследуемой свечи. Полный курс введения препаратов животным составил два месяца. Комплекс лабораторных диагностических исследований проводили через месяц после начала введения препарата животным - в середине курса (8 животных), через два месяца - по окончании курса (8 животных) и через три месяца - после окончания восстановительного периода продолжительностью один месяц (8 животных). Массу тела крыс в течение первого месяца введения препарата определяли еженедельно, в дальнейшем – один раз в две недели. На основании динамики показателя массы тела животного производили коррекцию вводимого объема препарата с учетом исследуемой дозы.

Результаты исследований приведены в табл.12, 13, 14

Таблица 12

Показатели периферической крови самцов крыс после введения исследуемых препаратов в свечах в течение 1 и 2 месяцев

Показатель крови	Контроль 1 мес./2 мес.	Сое- ди- не- ние	Доза 50 mg/kg 1 мес./2 мес.	Доза 500 mg/kg 1 мес./2 мес.
Гемоглобин, mmol/dm <sup>3</sup>	10,5±0,2 / 11,4±0,2	2	10,5±0,1/11,1±0,1	10,6±0,1/12,3±0,3*
		15	10,6±0,2/11,2±0,1	10,6±0,2/12,5±0,4*
		23	10,7±0,1/11,0±0,1	10,7±0,2/12,3±0,3*
		34	10,6±0,1/11,1±0,2	10,6±0,3/12,4±0,4*

		37	10,5±0,1/11,0±0,1	10,6±0,1/12,1±0,4*
Эритроциты, mln/mm <sup>3</sup>	5,6±0,1 / 6,1±0,1	2	5,6±0,2 / 6,1±0,1	5,6 ± 0,1 / 6,5 ± 0,1*
		15	5,7±0,2 / 6,0±0,1	5,7 ± 0,1 / 6,7 ± 0,2*
		23	5,7±0,1 / 6,0±0,2	5,7 ± 0,2 / 6,4 ± 0,2*
		34	5,6±0,1 / 6,1±0,2	5,6 ± 0,2 / 6,6 ± 0,1*
		37	5,6±0,2 / 6,2±0,1	5,7 ± 0,1 / 6,5 ± 0,2*
Гематокрит, %	45,9±1,7 / 45,9±1,8	2	47,8±1,3/47,9±1,5	47,5 ± 1,6/50,3 ± 2,0
		15	47,9±1,4/47,5±1,2	47,6 ± 1,3/53,9 ± 2,1*
		23	47,7±1,2/46,5±1,3	47,9 ± 1,1/49,4 ± 1,9*
		34	46,9±1,1/47,5±1,2	48,1± 1,5/53,1± 1,6*
		37	47,8±1,4/47,5±1,2	47,9 ± 1,8/52,5± 1,7*
Ср. объем эритроцитов, mkm <sup>3</sup>	81,4± 1,7/74,6± 1,9	2	83,4±1,4/77,9±2,1	85,2±1,2/72,0 ±2,5*
		15	84,4±1,5/78,6±1,5	82,6±1,1/80,2±1,2*
		23	82,7±1,6/77,5±1,7	83,5±1,7/82,1± 1,4*
		34	81,6±1,9/76,7±1,9	84,1± 1,3/83,8± 1,5*
		37	83,9±1,7/78,5±1,4	82,3 ± 1,5/80,1± 1,0*
Ретикуло- циты, %	2,8 ± 0,3/2,9 ± 0,2	2	2,8 ± 0,2/2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,3/3,5 ± 0,2
		15	2,6 ± 0,2/3,0 ± 0,1	3,1 ± 0,2/3,3 ± 0,3
		23	2,7 ± 0,3/2,8 ± 0,1	3,1± 0,1/3,4 ± 0,1
		34	2,7 ± 0,1/2,9 ± 0,2	3,2 ± 0,2/3,5 ± 0,3
		37	2,6 ± 0,1/3,1± 0,1	3,0 ± 0,2/3,4 ± 0,2
Тромбоциты, %	707 ± 23/593 ± 14	2	659 ± 26/566 ± 20	681 ± 26/583 ± 25
		15	678 ± 13/597± 24	683 ± 14/ 616 ± 40
		23	659 ± 18/586 ± 28	678 ± 18/628 ± 23
		34	670 ± 23/610 ± 15	682 ± 24/631± 26
		37	675 ± 22/609 ± 18	671 ± 26/639 ± 34
Время свертывае- мости, s	152 ± 10,2/316 ± 8	2	145 ± 16/322 ± 18	149 ± 11/305± 13
		15	140 ± 12,2/321± 12	151± 6,4/308 ± 16
		23	150 ± 15/313 ± 17	156 ± 11/317 ± 12
		34	148 ± 16/321 ± 10	165 ± 10/312 ± 9
		37	151 ± 13/319 ± 12	157± 14/316 ± 14

СОЭ, mm/h	$2,2 \pm 0,4/1,4 \pm 0,2$	2	$1,9 \pm 0,3/1,7 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3/1,9 \pm 0,1$
		15	$1,8 \pm 0,4/1,6 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,4/1,8 \pm 0,4$
		23	$1,7 \pm 0,8/1,5 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3/1,7 \pm 0,3$
		34	$1,8 \pm 0,5/1,7 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,4/1,8 \pm 0,2$
		37	$1,8 \pm 0,3/1,6 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,3/2,0 \pm 0,1$
Лейкоциты, thousand/mm <sup>3</sup>	$17,4 \pm 1,3/19,1 \pm 1,9$	2	$16,0 \pm 1,4/19,3 \pm 1,6$	$15,6 \pm 0,8/18,6 \pm 1,9$
		15	$14,8 \pm 2,0/16,3 \pm 1,0$	$17,0 \pm 1,4/21,1 \pm 2,4$
		23	$15,5 \pm 1,1/17,6 \pm 1,2$	$16,4 \pm 1,1/20,1 \pm 1,7$
		34	$15,9 \pm 1,3/17,8 \pm 1,4$	$16,9 \pm 1,0/22,1 \pm 1,1$
		37	$14,9 \pm 1,5/16,7 \pm 1,2$	$17,1 \pm 0,9/18,7 \pm 1,7$
Базофилы, %	0	2	0	0
		15	0	0
		23	0	0
		34	0	0
		37	0	0
Эозинофилы, %	$4,0 \pm 0,3/4,4 \pm 1,2$	2	$3,4 \pm 0,6/4,2 \pm 0,8$	$3,2 \pm 0,9/4,8 \pm 1,6$
		15	$3,2 \pm 1,0/3,6 \pm 1,2$	$3,0 \pm 1,0/3,2 \pm 1,4$
		23	$3,6 \pm 0,5/4,0 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,7/3,8 \pm 1,3$
		34	$3,5 \pm 1,0/4,1 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,9/3,9 \pm 1,4$
		37	$3,8 \pm 0,8/4,2 \pm 0,3$	$3,5 \pm 1,0/4,1 \pm 1,3$
Юные, %	0	2	0	0
		15	0	0
		23	0	0
		34	0	0
		37	0	0
Палочкоя- дерные, %	$0,8 \pm 0,4/2,4 \pm 0,4$	2	$0,8 \pm 0,3/1,7 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2/1,1 \pm 0,3$
		15	$1,2 \pm 0,5/0,8 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,5/0,8 \pm 0,5$
		23	$1,1 \pm 0,5/1,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,3/1,6 \pm 0,2$
		34	$1,0 \pm 0,4/1,8 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,2/1,4 \pm 0,3$
		37	$1,3 \pm 0,5/1,9 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,4/1,1 \pm 0,6$
Сегментоя- дерные, %	$29,2 \pm 2,4/23,0 \pm 1,2$	2	$25,2 \pm 1,7/27,8 \pm 3,4$	$27,1 \pm 1,5/24,8 \pm 2,6$
		15	$27,4 \pm 1,3/26,2 \pm 2,2$	$26,3 \pm 1,2/22,4 \pm 1,5$

		23	$24,0 \pm 1,4/28,6 \pm 4,2$	$28,2 \pm 1,7/25,3 \pm 1,8$
		34	$25,6 \pm 1,2/25,2 \pm 2,7$	$26,4 \pm 1,0/24,7 \pm 2,3$
		37	$28,3 \pm 1,6/26,0 \pm 3,6$	$27,9 \pm 1,1/25,2 \pm 2,8$
Лимфоциты, %	$60,2 \pm 1,8/64,8 \pm 1,6$	2	$61,4 \pm 1,8/63,9 \pm 2,1$	$59,2 \pm 1,3/68,1 \pm 1,7$
		15	$65,0 \pm 1,5/61,8 \pm 2,5$	$61,6 \pm 2,5/67,6 \pm 1,3$
		23	$64,2 \pm 1,8/63,0 \pm 3,7$	$63,7 \pm 1,9/68,7 \pm 1,4$
		34	$63,8 \pm 1,6/62,8 \pm 2,9$	$62,9 \pm 1,6/67,9 \pm 2,1$
		37	$65,0 \pm 1,2/63,4 \pm 1,9$	$64,0 \pm 1,7/66,3 \pm 1,9$
Моноциты, %	$5,8 \pm 0,7/5,4 \pm 0,6$	2	$5,9 \pm 0,8/5,7 \pm 0,7$	$6,0 \pm 1,1/5,9 \pm 1,1$
		15	$6,6 \pm 0,9/7,6 \pm 1,0$	$6,4 \pm 0,9/6,0 \pm 0,9$
		23	$6,5 \pm 0,7/6,9 \pm 1,0$	$6,1 \pm 1,4/6,2 \pm 0,7$
		34	$5,8 \pm 0,9/6,2 \pm 0,9$	$5,9 \pm 0,8/6,0 \pm 1,0$
		37	$6,0 \pm 1,2/6,4 \pm 0,7$	$6,1 \pm 1,3/6,3 \pm 0,7$

Таблица 13

Биохимические показатели сыворотки крови самцов крыс после 1 месяц введения свечей с содержанием соединений согласно изобретению

Показатель	Контроль	Соединение	Доза 50 mg/kg	Доза 500 mg/kg
Общий белок, g/l	$94,89 \pm 6,67$	2	$87,34 \pm 5,56$	$70,84 \pm 7,47$
		15	$90,22 \pm 6,78$	$71,56 \pm 8,23$
		37	$89,44 \pm 7,22$	$70,88 \pm 7,24$
Глюкоза, mmol/l	$9,76 \pm 0,15$	2	$9,85 \pm 0,37$	$10,20 \pm 0,74$
		15	$10,00 \pm 0,41$	$10,71 \pm 0,41$
		37	$9,9 \pm 0,51$	$10,93 \pm 0,84$
Мочевина, mkmol/l	$8,44 \pm 0,60$	2	$11,02 \pm 0,73$	$11,30 \pm 0,80$
		15	$10,33 \pm 0,51$	$10,89 \pm 0,73$
		37	$9,36 \pm 0,62$	$10,57 \pm 0,56$
Холестерин, mmol/l	$3,02 \pm 0,08$	2	$2,77 \pm 0,71$	$2,96 \pm 0,52$
		15	$2,01 \pm 0,50$	$2,30 \pm 0,57$
		37	$2,48 \pm 0,62$	$2,64 \pm 0,46$



57

Креатинин, mkmol/l	40,23 ± 2,84	2	47,38 ± 3,26	49,87 ± 8,12
		15	45,59 ± 2,68	48,27 ± 12,29
		37	46,84 ± 2,92	47,13 ± 9,82
ALT, unit/l	11,33 ± 1,96	2	10,84 ± 2,02	11,23 ± 1,70
		15	7,63 ± 1,95	9,48 ± 1,85
		37	8,98 ± 2,43	9,56 ± 1,34
AST, unit/l	19,13 ± 1,02	2	20,41 ± 3,06	20,13 ± 2,95
		15	19,49 ± 2,90	15,14 ± 1,58
		37	19,97 ± 2,78	18,21 ± 1,87
Щелочная фосфатаза, unit/l	40,74 ± 1,57	2	42,12 ± 4,23	43,4 ± 2,12
		15	40,74 ± 6,78	41,60 ± 2,26
		37	41,86 ± 5,26	42,18 ± 2,34
Билирубин, mmol/l	35,93 ± 2,19	2	44,38 ± 4,12	42,56 ± 7,56
		15	43,07 ± 3,57	40,69 ± 15,75
		37	42,17 ± 3,28	41,45 ± 7,18

Таблица 14

Показатели мочи крыс через 1 месяц введения соединений согласно изобретению в свечах

Показатель	Контроль	Соединение	Доза 50 mg/kg	Доза 500 mg/kg
Белок, g/l	0,74 ± 0,26	2	0,69 ± 0,33	0,76 ± 0,31
		15	0,71 ± 0,274	0,87 ± 0,24
		37	0,70 ± 0,19	0,72 ± 0,14
Мочевина, mmol/l	472 ± 140	2	457 ± 144	492 ± 187
		15	413 ± 128	485 ± 131
		37	427 ± 137	489 ± 152
Глюкоза, mmol/l	< 6	2	< 5	< 5
		15	< 6	< 6
		37	< 5	< 5
Калий, g/l	5,96 ± 1,1	2	5,78 ± 1,7	6,24 ± 1,8
		15	5,28 ± 1,5	6,13 ± 1,6

		37	$6,12 \pm 1,4$	$6,44 \pm 1,3$
Натрий, g/l	$0,9 \pm 0,1$	2	$1,7 \pm 0,3$	$1,27 \pm 0,3$
		15	$1,2 \pm 0,4$	$0,64 \pm 0,4$
		37	$1,4 \pm 0,2$	$0,88 \pm 0,4$
Уробилиноген, mkmol/l	<17	2	<16	<16
		15	<17	<17
		37	<15	<15
pH	$6,2 \pm 0,3$	2	$6,1 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,2$
		15	$6,3 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,3$
		37	$6,4 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,3$
Билирубин, mkmol/l	<5	2	<5	<5
		15	<5	<5
		37	<5	<5
Кетоновые тела, mmol/l	<1	2	<1	<1
		15	<1	<1
		37	<1	<1

На протяжении курса введения препаратов у животных всех групп независимо от дозы препаратов было отмечено стабильное клиническое состояние без признаков интоксикации, внешний вид и поведенческие реакции были обычными для здоровых крыс, потребление корма и воды соответствовало физиологической норме.

Из приведенных в табл. 12, 13, 14 результатов исследований видно, что после 1 месяца введения соединений согласно изобретению в свечах изменений в показателях периферической крови животных не обнаружено. После 2 месяцев введения свечей у животных, получавших свечи с дозой 50 mg/kg, достоверных различий в показателях периферической крови не обнаружено. У животных, получавших свечи в дозе 500 mg/kg, отмечены отдельные изменения, в частности, достоверно увеличены значения общего количества эритроцитов, гемоглобина, гематокритной величины и среднего объема эритроцитов, в некоторых случаях отмечено уменьшение времени свертываемости крови по сравнению с контролем.

Исследование биохимических показателей сыворотки крови и мочи после длительного введения соединений согласно изобретению в свечах не выявило различий между подопытными и контрольными животными.

Патологоанатомические исследования через один месяц после начала введения свечей и по окончании полного курса введения показали, что при вскрытии обнаруживалась одинаковая картина без признаков патологии: шерстяной покров был гладким, блестящим; кожа – эластичной, подвижной; подкожная жировая клетчатка умеренно выражена. Легкие – воздушные, бледно-розового цвета, с разреза паренхимы стекает небольшое количество пенистой красноватой жидкости. Печень – эластичная, имеет обычную форму, края органа слегка закруглены, капсула гладкая, блестящая, ткань органа на разрезе темно красная, полнокровная, блестящая. Почки – окружены умеренным количеством жировой ткани, имеют бобовидную форму, эластичные, капсула блестящая, чистая, легко снимается. Корковое и мозговое вещество имеют обычный рисунок с выраженной разделительной границей, в лоханках – небольшое количество прозрачной, слегка опалесцирующей, жидкости. Надпочечники – округлой формы, на срезе отчетливо дифференцированы на более светлое- корковое вещество и более темное – мозговое. Селезенка – удлинённой формы, капсула блестящая, пульпа темно-вишневого цвета, с поверхности разреза соскабливается незначительное количество ткани и кровянистой жидкости. Толстый кишечник – с небольшим количеством слизи, без признаков вздутия, сосудистый рисунок умеренно выражен, слизистые чистые, без изъязвлений, каловые массы в концевом отделе сформированы. Семенники – овальной формы, плотной консистенции, с умеренно выраженной сосудистой сетью.

Динамика массы тела крыс во время введения препаратов (1-9 недели) была положительной и не отличалась от динамики в контрольной группе.

При исследованиях также определяли наличие раздражающего действия свечей на слизистую оболочку кишечника и резорбтивного действия: на крысах с массой тела  $169 \pm 7$  g, доза 500 mg/kg однократно, обследование патологоанатомическое через 30 минут и через 2 часа после введения свечи, и через 24 часа. При исследовании прямой кишки обнаружено умеренное количество слизи в просвете кишки, отсутствие отека или гиперемии слизистой оболочки.

Также определяли наличие раздражающего действия свечей на слизистые оболочки глаза: на 5 кроликах породы шиншилла массой тела 2,6- 2,9 kg, введение препарата в количестве 75 mg при 37-38°C в конъюнктивальный мешок одного глаза, наблюдали через 15, 30, 60 и 120 минут после введения и затем в течение 24 часов. Не было установлено каких-либо воспалительных явлений, не было слезотечения, отеков или инъекции сосудов склеры и конъюнктивы.

Кроме того, определяли наличие раздражающего действия свечей на кожу: нанесли 10 крысам массой тела  $175 \pm 6$  g и 6 морским свинкам массой тела  $235 \pm 17$  g с белым шерстяным покровом на депилированные участки кожи размером  $2 \times 2$  см препараты, содержащие соединения согласно изобретению в свечной массе, подогретой до  $37-38^{\circ}\text{C}$  в количестве 1000 mg. Продолжительность аппликации составляла 4 часа. Не было отмечено гиперемии кожи, утолщения кожной складки или каких-либо других признаков раздражения. В течение времени аппликации и в течение 24 после нее изменений клинического состояния экспериментальных животных не обнаружено.

Таким образом, установлено отсутствие местного раздражающего и токсического резорбтивного действия препаратов, содержащих соединения согласно изобретению, при однократном применении в значительной дозе.

Для специалистов в области медицины и биоорганической химии должно быть ясно, что описанные выше свойства соединений согласно изобретению могут проявляться и в нормализации других возникающих в организме процессов, связанных с метаболическим ацидозом и воздействием избыточного количества свободнорадикальных форм кислорода, в частности, неконтролируемых воспалений, неконтролируемого протеолиза, недостаточной активностью фермента хеликазы, отвечающего за раскручивание двойной спирали ДНК в репликационной вилке, неконтролируемых окислительно-восстановительных процессов, процессов преждевременного старения организма, с влиянием на электронно-протонные процессы в митохондриях и на функционирование дыхательной цепи.

Применение циклических биоизостеров производных пуриновой системы согласно изобретению или их фармакологически приемлемых солей в качестве активных ингредиентов фармацевтической композиции позволяет создавать фармацевтические композиции широкой области применения.

При этом они оказывают нормализующее воздействие на жизненно важные системы организма, которое, в зависимости от показаний, от количества активного ингредиента в лекарственном препарате, от величины дозы, от условий введения в организм, от режима приема препарата, может быть спрогнозировано и выбрано оптимальным.

Фармацевтически приемлемыми солями циклических биоизостеров производных пуриновой системы, согласно изобретению, могут являться соли фармацевтически приемлемых металлов, таких, как литий, натрий, калий,

кальций, барий, серебро, а также соли фармацевтически приемлемых кислот, такие, как гидрохлориды, сульфаты, ацетаты, гидробромиды, фосфаты, сукцинаты, малеаты, фумараты, цитраты, глюконаты, метилсульфонаты, п-толуолсульфонаты. Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены при взаимодействии циклических биоизостеров производных пуриновой системы с соответствующими кислотами или основаниями.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может в качестве активного ингредиента содержать композицию из нескольких соединений согласно изобретению, например, солей щелочных и/или щелочноземельных металлов, например, композицию натриевой и калиевой солей, натриевой и литиевой и других, которые хорошо совместимы между собой и, в зависимости от их биологической активности, могут, например, увеличивать продолжительность действия лекарственного препарата в организме.

Фармацевтическая композиция на основе соединений согласно изобретению может представлять собой раствор активного ингредиента в фармацевтически приемлемом жидком носителе или растворителе, например, в воде, физиологическом растворе, буферных растворах, или совместимого с ингредиентами, увеличивающими их растворимость.

Фармацевтическая композиция может представлять собой тонкодисперсный порошок активного ингредиента, пригодный для применения в растворах для инъекций, в аппликациях, в приготовлении различных лекарственных форм.

Оральное введение представляет обычно предпочтительный путь для введения лекарственных средств в организм, так как этот путь является наиболее удобным и приемлемым для пациента. Композиции согласно изобретению могут быть выполнены в виде средств для орального введения, например, таблеток, гранул, шариков, порошков, капсул, ампул, суспензий, эмульсий. При этом фармацевтическая композиция может дополнительно содержать средства повышения биодоступности, например, микрокристаллическую целлюлозу, что позволяет уменьшить содержание биологически активного ингредиента в разовой дозе лекарственного средства, или, кроме того, может быть выполнена в виде спонтанно диспергируемого концентрата, который при смешивании с дистиллированной водой или физиологическим раствором поваренной соли создает водные микроэмульсии, фазовоустойчивые, с повышенной способностью проникновения и распространения.

Желательно, чтобы, особенно при лечении острых состояний, фармацевтическая композиция обладала быстрым и последовательным наступлением воздействия и хорошей биологической совместимостью компонентов композиции и среды.

Быстрое поглощение активного ингредиента может быть достигнуто парентеральной инъекцией, что для клинических условий является традиционным, но это является неприемлемым при самолечении. В этом случае эффективным является доставка лекарственного средства в организм ректально, с помощью суппозитория, клизм, мягких желатиновых капсул, свечей, например, в виде твердых дозированных форм с пригодной конфигурацией, которые либо плавятся при температуре тела, либо растворяются или диспергируются в полости слизистой секреции. Циклические биоизостеры производных пуриновой системы согласно изобретению хорошо сочетаются с известными компонентами и ингредиентами, применяемыми для изготовления лекарственных препаратов.

Специалистам в области медицины известно, что для улучшения адсорбции биологически активных веществ, имеющих недостаточную растворимость в воде или в каких-либо избирательных средах, активный ингредиент фармацевтической композиции в форме высоконасыщенного раствора, в твердой форме может быть инкапсулирован в одной или более пластинчатой мембране, содержащей липиды, например, в липосомах, позволяющих доставлять активный ингредиент в специфическую область.

Согласно изобретению, в фармацевтической композиции производные фтагидразинов и их соли могут содержаться в липосомальной форме, например, в многофазной липосомной системе доставки лекарств, которая является стабильной и может быть легко разбавлена водой, варьируя состояние фармацевтической композиции от состояния разбавленной жидкости до желатинового состояния, что является важным для производных соединений, в исходном состоянии плохо растворимых в среде желудочно-кишечного тракта, а также расширяет возможности применения более высоких доз активного ингредиента при введении orally.

Кроме того, в фармацевтической композиции, согласно изобретению, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой композицию, содержащую фармакологически активные добавки.

При этом, согласно изобретению, фармакологически активные добавки могут быть выбраны из группы, включающей стабилизаторы, диспергаторы, ароматизаторы,

эмульгаторы, проводники, средства повышения биодоступности, одним из которых может быть средство для повышения растворимости труднорастворимых соединений, например, растворитель диметилсульфоксид (ДМСО).

При многих заболеваниях целесообразно использовать различные способы местного воздействия на патологический процесс, особенно при наличии противопоказаний к общей терапии, например, при значительном нарушении жизненно важных органов. Одним из способов местного воздействия является применение наружных лекарственных средств.

Известно, что, исходя из чувствительности кожи, вероятности ее раздражения и трансдермальной абсорбционной способности (гигрокопичности кожи), pH фармацевтического препарата для наружного применения желательно поддерживать в интервале 4-8, более предпочтительно, в интервале 5-7. Когда pH слишком мало (pH 3 и менее), его высокая кислотность вызывает сильное раздражение кожи. Когда pH слишком велико (pH 9 и более), трансдермальное всасывание активного ингредиента снижается, раздражение кожи усиливается.

Для усиления трансдермального поглощения (всасывания) активного ингредиента к фармацевтическому препарату могут добавлены так называемые усилители поглощения, например, органические основания, например, триэтаноламин, кротамитон, сложные эфиры жирных кислот со средней длиной цепи, 1-ментол, бензиловый спирт и им подобные вещества. Органическое основание облегчает высвобождение активного ингредиента из основы, поскольку делает его более водорастворимым благодаря образованию солей. Органическое основание действует, как регулятор pH лекарственного препарата.

Для регулирования pH лекарственного средства также используют щелочные соединения (гидроокись калия и натрия, триэтаноламин, диизопропаноламин, моноэтаноламин и другие).

Растворы металлических солей соединений согласно изобретению имеют pH 7-8, растворы гидрохлоридов, ацетатов, фосфатов, гидробромидов, нитратов, сульфатов и других органических солей соединений согласно изобретению имеют pH 4-7, что создает хорошие перспективы создания лекарственных средств для наружного применения.

При этом фармацевтическая композиция для наружного применения может представлять собой гель-эмульсию, содержащую в качестве активного ингредиента биоизостер производного пуриновой системы согласно изобретению, гидрофильный

полимер, маслянистое вещество, неионный поверхностно-активный агент, щелочное соединений или органическое основание в качестве регулятора pH среды и воду. При этом биоизостеры производных пуриновой системы согласно изобретению химически совместимы с этими ингредиентами.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может быть выполнена в виде, например, исчезающей эмульсии, включающей высший спирт, углеводород, сложный эфир жирной кислоты, многоатомный спирт или щелочь, антисептик, воду и другие ингредиенты.

Возможны фармацевтические композиции на основе соединений согласно изобретению, например, в виде гелей, с применением в качестве гелеобразователей производных целлюлозы, например, оксиэтилцеллюлозы, окипропилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы и других производных, содержащих крахмал, желатин, синтетические полимеры, например, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, смачивающие агенты, например, многоатомные спирты, такие, как глицерин, 1,3-бутиленгликоль, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и другие.

Фармацевтическая композиция на основе биоизостеров производных пуриновой системы согласно изобретению может представлять собой гидрофильную мазь или гигроскопическую мазевую эмульсию, содержащие белый вазелин, жидкий парафин, поверхностно-активное вещество, в качестве которых могут быть использованы, например, сложные эфиры сорбитана и жирных кислот (сорбитанмоностеарат и эфиры), сложные эфиры глицерина и жирных кислот (глицерилмоностеарат, диглицерилмоноолеат и другие), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (полиоксиэтиленмоностеарат и другие), сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот, полиэтиленовое гидрогенизированное касторовое масло, смесь этих веществ, и другие компоненты, например, высшие спирты, такие, как углеводород, например, парафин, церезин, цетиловый спирт (цетанол), стеариловый спирт, олеиловый спирт, бегениловый спирт, эфиры жирной кислоты, например, стеариновой, олеиновой, многоатомный спирт, масло и жиры растительного происхождения, например, оливковое, масло жожоба, касторовое масло, животные жиры (говяжье и свиное сало, конский жир и другие жиры), горный воск, пчелиный воск, а также антисептик, например, метилпарабен, пропилпарабен, и воду.

#### Промышленная применимость

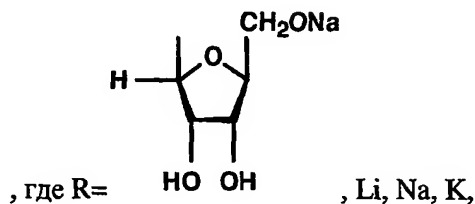
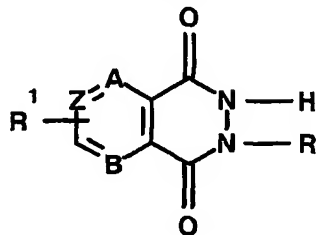
Применение циклических биоизостеров производных пуриновой системы согласно изобретению или их фармакологически приемлемых солей в качестве



активных ингредиентов фармацевтической композиции позволяет создавать фармацевтические композиции широкой области применения с использованием терапевтического эффекта, обусловленного выявленными свойствами циклических биоизостеров пуриновой системы согласно изобретению.

## Формула изобретения

1. Циклический биоизостер производных пуриновой системы, имеющий общую структурную формулу



$R^1 = -H, -NH_2, -Br, -Cl, -OH, -COOH,$

$B = -N=, -CH=, Z = -CH=, -N=,$

$A = -N=$  при  $B = -N=, Z = -CH=,$

$A = -CH=$  при  $B = -N=, Z = -CH=,$

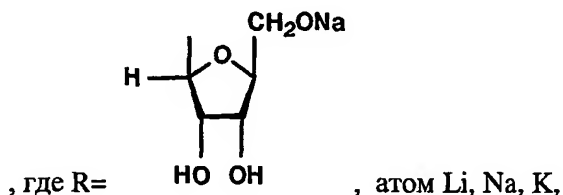
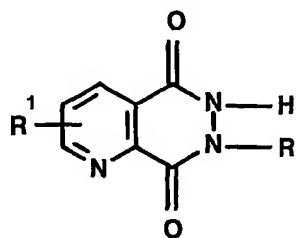
$A = -CH=$  при  $B = -N=, Z = -N=,$

$A = -CH=$  при  $B = -CH=, Z = -CH=,$

$A = -CH=$  при  $B = -CH=, Z = -N=,$

и его фармакологически приемлемые соли, обладающие нормализующим действием на внутриклеточные процессы.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что является производным пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона, имеющим общую формулу



$R^1 = -H, -NH_2, -Br, -OH, -COOH.$

3. Соединение по п. 1 или 2, отличающиеся тем, что выбрано из группы, включающей:

7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (1),

4-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (2),

3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (3),

4-гидрокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (4),

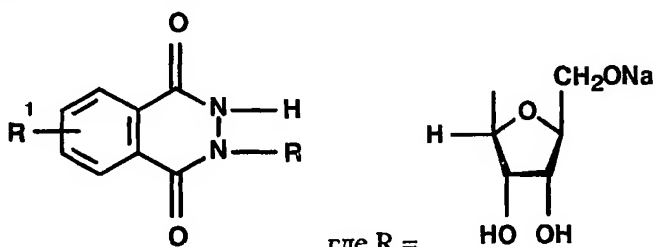
3-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиридо[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (5),

пиридо [2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона литиевая соль (6),

пиридо [2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (7),

пиридо [2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона калиевая соль (8).

4. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что является производным бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона, имеющим общую формулу:



$R^1 = -H, -NH_2, -Cl, -OH, -COOH$ .

5. Соединение по п. 1 или 4, отличающееся тем, что выбрано из группы, включающей:

2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (9),

5-амино-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (10),

6-амино-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (11),

5-хлор-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (12),

5-гидрокси-2-(β-D-рибофуранозил)бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона динатриевая соль (13),

5-амино-бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона литиевая соль (14),

5-амино-бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона натриевая соль (15),

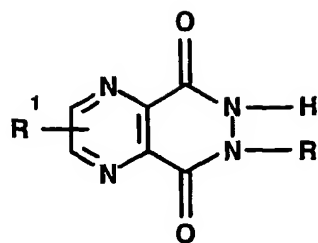
6-амино-бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона калиевая соль (16),

5-гидрокси-бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона динатриевая соль (17),

6-карбокси-бензо[d]-3Н-пиридазин-1,4-диона динатриевая соль (18).

6. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что является производным пиразино[2,3-d]-6Н-пиридазин-5,8-диона, имеющим общую формулу:

68

, где R = , атом Li, Na, K,

R¹ = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH.

7. Соединение по п. 1 или 6, отличающееся тем, что выбрано из группы, включающей:

7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (19),

2-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (20),

3-амино-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (21),

3-бром-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (22),

2-гидрокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (23),

2-карбокси-7-(β-D-рибофуранозил)пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона динатриевая соль (24),

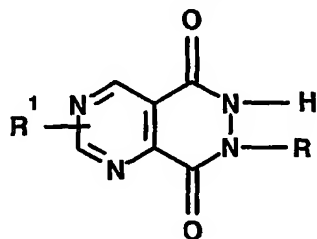
пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона литиевая соль (25),

пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (26),

3-бром-пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона калиевая соль (27),

2-амино-пиразино[2,3-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (28).

8. Соединение по п.1, отличающееся тем, что является производным пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона, имеющим общую формулу:

, где R = , атом Li, Na, K,

R¹ = -H, -NH₂, -Br, -OH, -COOH.

9. Соединение по п. 1 или 8, отличающееся тем, что выбрано из группы, включающей:

- 7-( $\beta$ -D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (29),  
2-амино-7-( $\beta$ -D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (30),  
4-амино-7-( $\beta$ -D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (31),  
2-бром-7-( $\beta$ -D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (32),  
4-гидрокси-7-( $\beta$ -D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (33),  
4-карбокси-7-( $\beta$ -D-рибофуранозил)пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (34),  
пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона литиевая соль (35),  
2-амино-пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона натриевая соль (36),  
4-бром-пиримидо[4,5-d]-6H-пиридазин-5,8-диона калиевая соль (37).

10. Соединение по любому из п.п. 1-9, отличающееся тем, что обладает способностью устранять внутриклеточный метаболический ацидоз. (9)

11. Соединение по любому из п.п. 1-9, отличающееся тем, что обладает способностью связывать избыточно образующиеся в клетке свободные радикалы. (9)

12. Соединение по любому из п.п. 1-9, 11, отличающееся тем, что обладает способностью связывать избыточно образующиеся в клетке свободнорадикальные формы кислорода. (10)

13. Соединение по любому из п.п. 1-9, 11, отличающееся тем, что обладает способностью нормализовать нитрегенные механизмы клеток. (10)

14. Соединение по любому из п.п. 1-9, отличающееся тем, что обладает способностью взаимодействия с аденозинчувствительными рецепторами. (9)

15. Соединение по любому из п.п. 1-9, отличающееся тем, что обладает способностью взаимодействия с аденозинчувствительными рецепторами на мембране неядерных клеток. (9)

16. Соединение по любому из п.п. 1-9, 15, отличающееся тем, что обладает способностью снижать агрегацию тромбоцитов. (10)

17. Соединение по любому из п.п. 1-9, отличающееся тем, что обладает способностью взаимодействия с аденозинчувствительными рецепторами внутриядросодержащих клеток. (9)

18. Соединение по любому из п.п. 1-13, отличающееся тем, что обладает (13)

гепатопротекторным действием.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая биологически активный ингредиент и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что в качестве биологически активного ингредиента содержит соединение по любому из п.п.1-18 в эффективном количестве. (18)

20. Композиция по п.19, отличающаяся тем, что в качестве активного ингредиента содержит соль соединения по любому из п.1-9. (19)

21. Композиция по п. 19 или 20, отличающаяся тем, что активный ингредиент выбран из группы, включающей соли щелочных и щелочноземельных металлов. (2)

22. Композиция по п. 20, отличающаяся тем, что активный ингредиент выбран из группы, включающей гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, фосфаты, цитраты, тартраты, фумараты, оксалаты, малеаты, ацетаты, нитраты. (1)

23. Композиция по любому из п.п. 19-21, отличающаяся тем, что активный ингредиент представляет собой композицию солей, выбранных из группы, включающей соли щелочных и щелочноземельных металлов, в любом их количественном соотношении. (3)

24. Композиция по любому из п.п. 19-20,22, отличающаяся тем, что активный ингредиент представляет собой композицию солей, выбранных из группы, включающей гидрохлориды, гидробромиды, сульфаты, фосфаты, цитраты, тартраты, фумараты, оксалаты, малеаты, ацетаты, нитраты, в любом их количественном соотношении. (3)

25. Композиция по любому из п.п.19-24, отличающаяся тем, что биологически активный ингредиент содержится в липосомальной форме. (6)

26. Композиция по любому из п.п.19-25, отличающаяся тем, что фармацевтически приемлемый носитель представляет собой композицию, содержащую фармакологически активные добавки. (2)

27. Композиция по п.26, отличающаяся тем, что фармакологически активные добавки выбраны из группы, включающей стабилизаторы, диспергаторы, ароматизаторы, эмульгаторы, проводники, средства повышения биодоступности. (1)

28. Композиция по любому из п.п. 19-27, отличающаяся тем, что представляет собой активный ингредиент в фармацевтически приемлемом жидком носителе или растворителе. (9)

29. Композиция по п. 28, отличающаяся тем, что жидкий носитель выбран из группы, включающей воду, физиологическую жидкость, буферные растворы. (15)

30. Композиция по любому из п.п. 19-27, отличающаяся тем, что представляет собой тонкодисперсный порошок активного ингредиента, необязательно в фармацевтически приемлемом жидком носителе или растворителе. (9)

31. Композиция по любому из п.п. 19-30, отличающаяся тем, что она приспособлена для введения способом, выбранным из группы, включающей энтеральное, парэнтеральное ингаляционное, ректальное, вагинальное, наочное, чреочное, интраназальное введение, введение путем аппликации. (12)

32. Композиция по любому из п.п. 19-31, отличающаяся тем, что приспособлена для местного введения. (13)

33. Композиция по любому из п.п. 19-32, отличающаяся тем, что приспособлена для доставки к месту введения с помощью устройства. (14)

34. Композиция по любому из п.п. 19-33, отличающаяся тем, что приспособлена для введения активным способом. (15)

35. Композиция по любому из п.п. 19-33, отличающаяся тем, что приспособлена для введения пассивным способом. (15)

36. Композиция по любому из п.п. 19-33, отличающаяся тем, что представляет собой спонтанно диспергируемый концентрат. (15)

37. Композиция по любому из п.п. 19-33, отличающаяся тем, что выполнена в лекарственной форме, обеспечивающей регулируемое высвобождение активных ингредиентов композиции. (15)

38. Композиция по любому из п.п. 19-37, отличающаяся тем, что дополнительно содержит один или несколько агентов, изменяющих скорость высвобождения активного ингредиента. (19)

39. Композиция по любому из п.п. 19-38, отличающаяся тем, что она приспособлена для введения в дозированном количестве. (20)

40. Композиция по любому из п.п. 19-39, отличающаяся тем, что приспособлена для применения в твердом, полутвердом, жидком, суспензионном, аэрозольном виде. (21)

41. Композиция по любому из п.п. 19-40, отличающаяся тем, что приспособлена для размещения в фармацевтически приемлемых средствах аппликации. (22)

42. Композиция по любому из п.п. 2-31, отличающаяся тем, что приспособлена для введения в лекарственной форме, выбранной из группы, включающей таблетки, гранулы, шарики, порошки, капсулы, ампулы, сухие препараты, которым перед применением придается форма раствора или эмульсии, свечи, тампоны, мази, гели, (30)

375

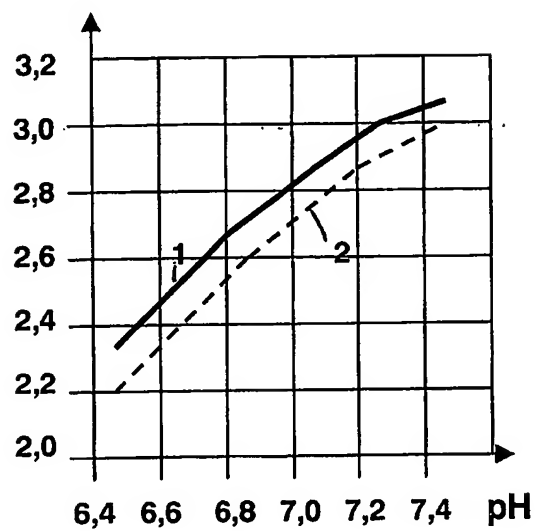
375  
383

золи, растворы для инъекций, суспензии, эмульсии, капли, сиропы, пластыри, аппликации, пленки, аэрозоли, спрей.



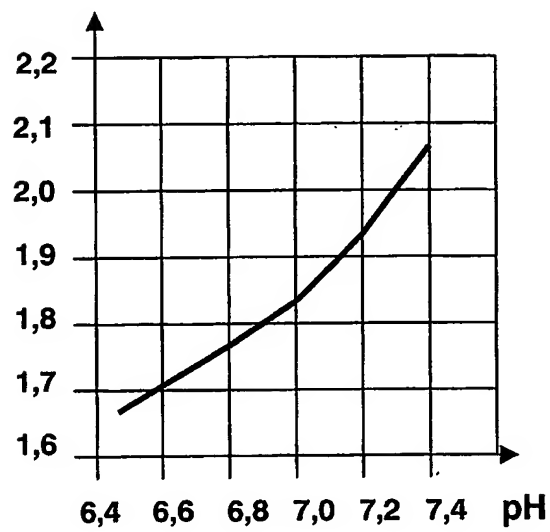
1 / 7

$$K = I_{530} / I_{570}$$

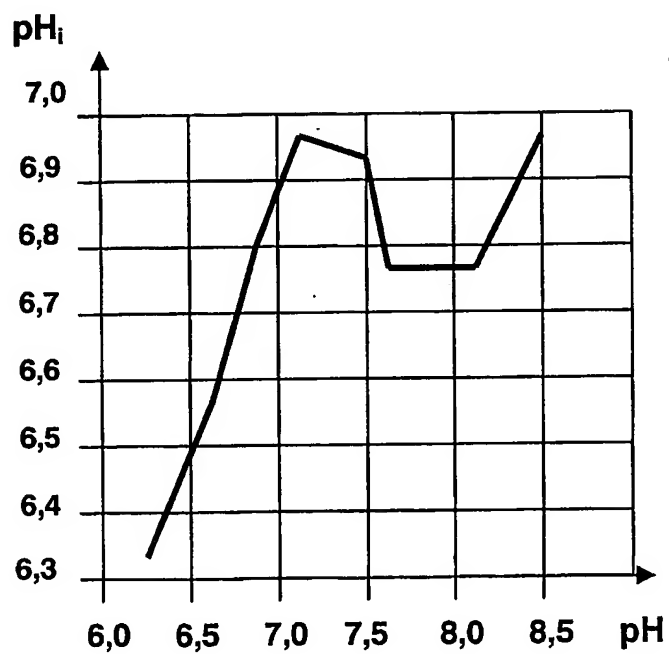


Фиг. 1a

$$K = I_{530} / I_{570}$$

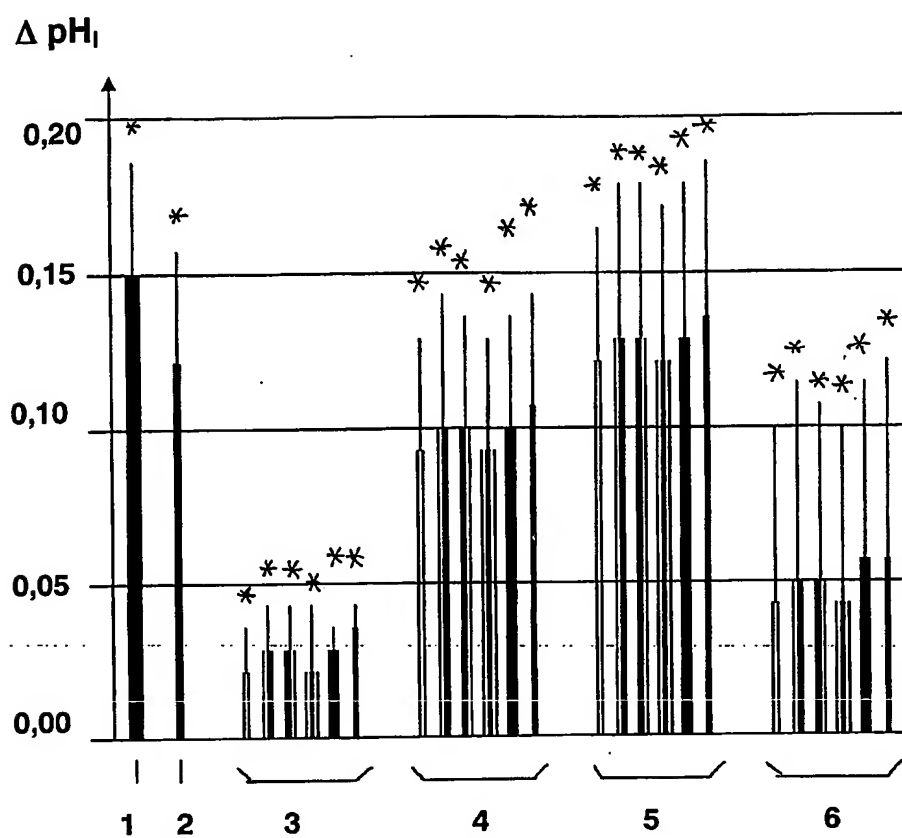


Фиг.1b

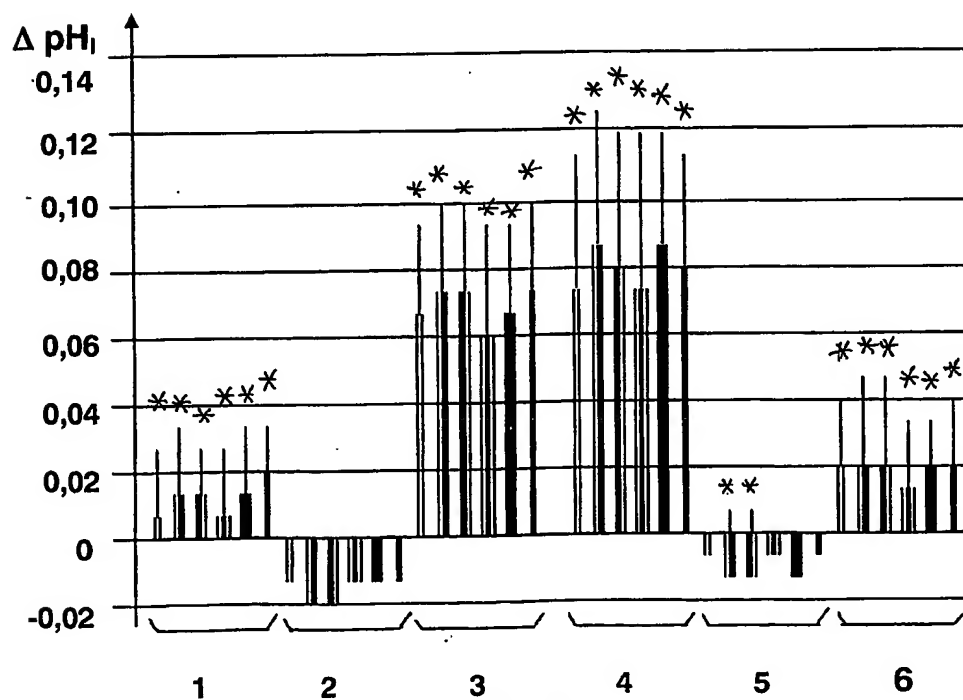


Фиг. 2

2 / 7

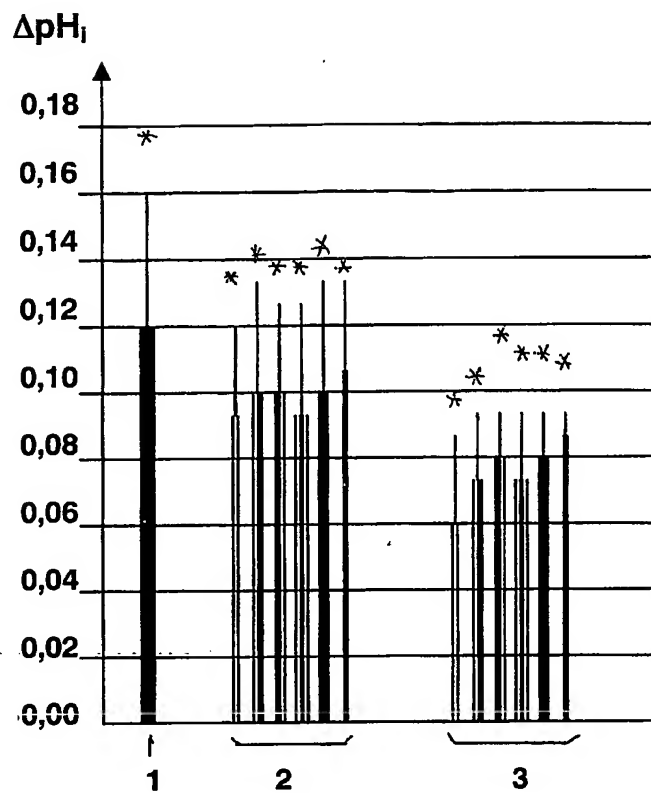


Фиг.3

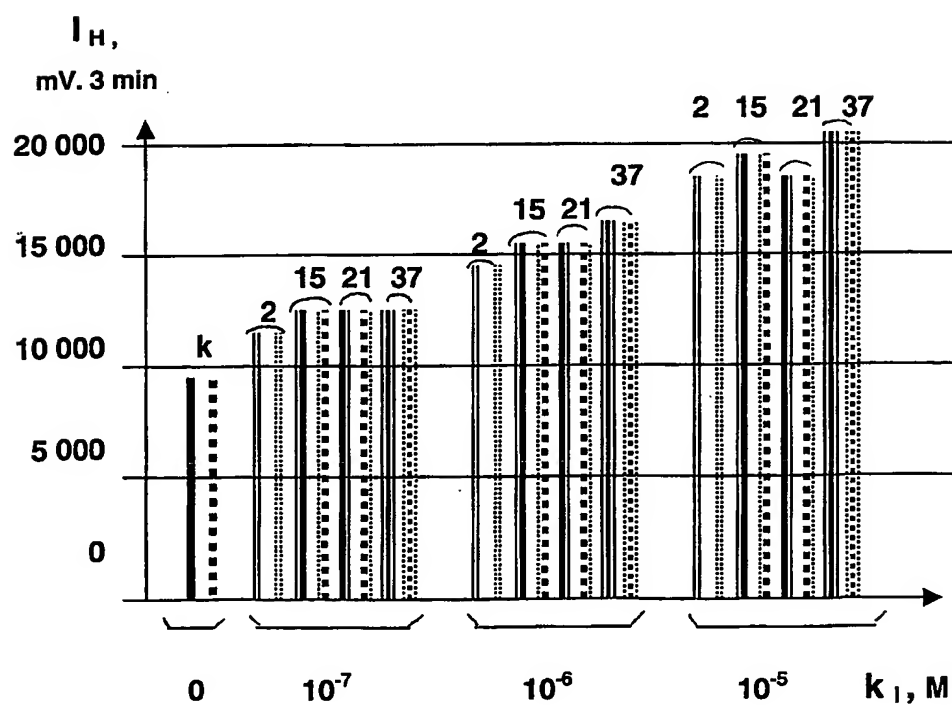


Фиг.4

3/7

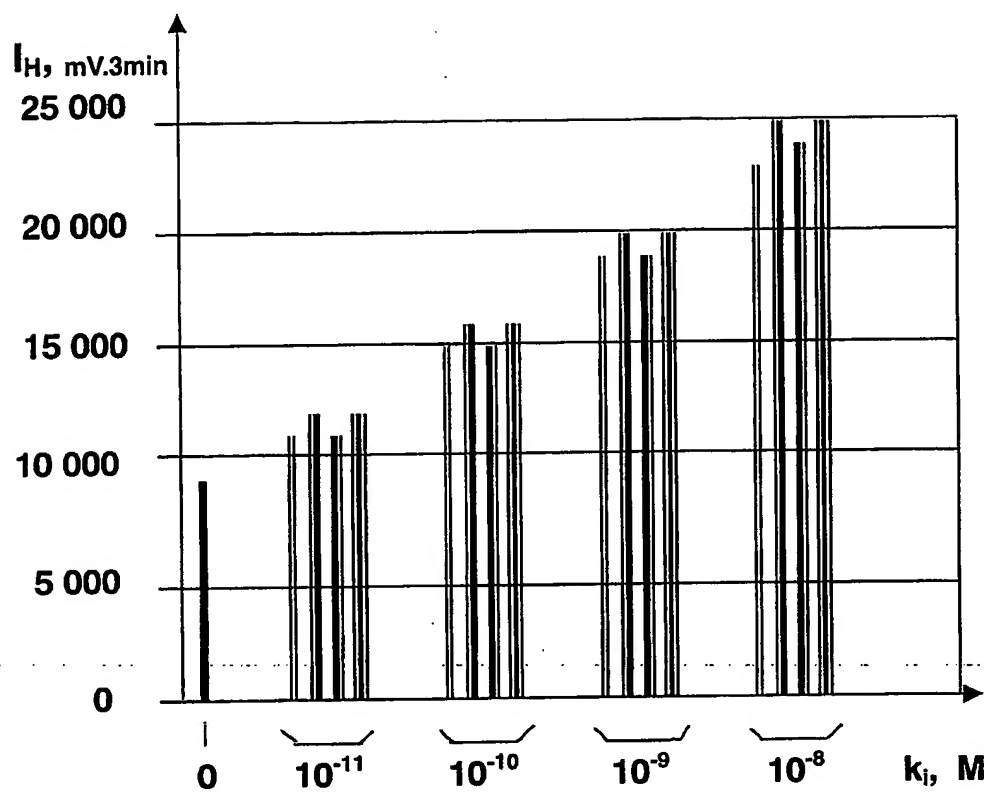


Фиг.5

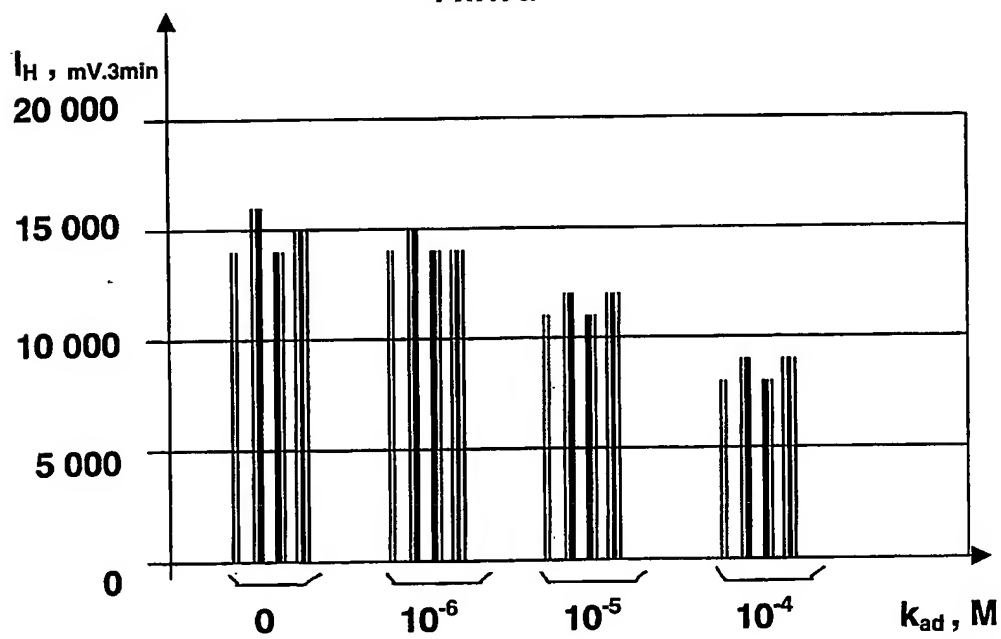


Фиг.6

4 / 7

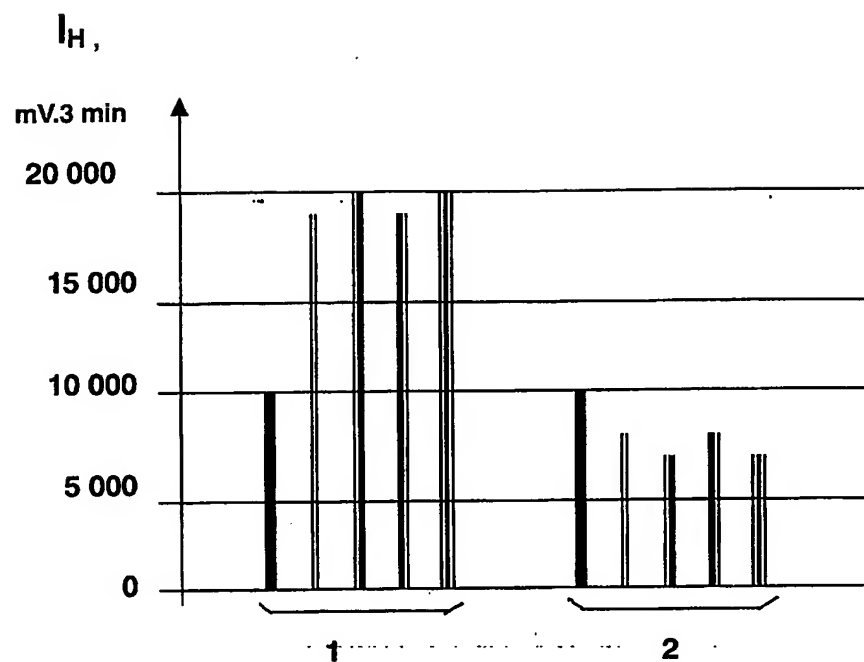


Фиг.7а

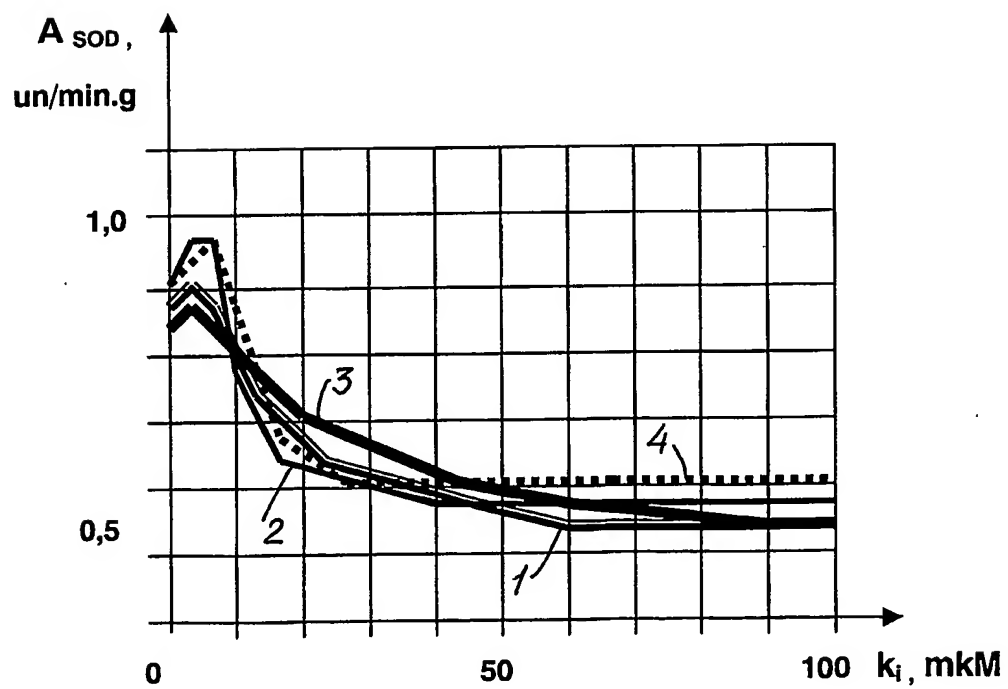


Фиг.7б

5 / 7

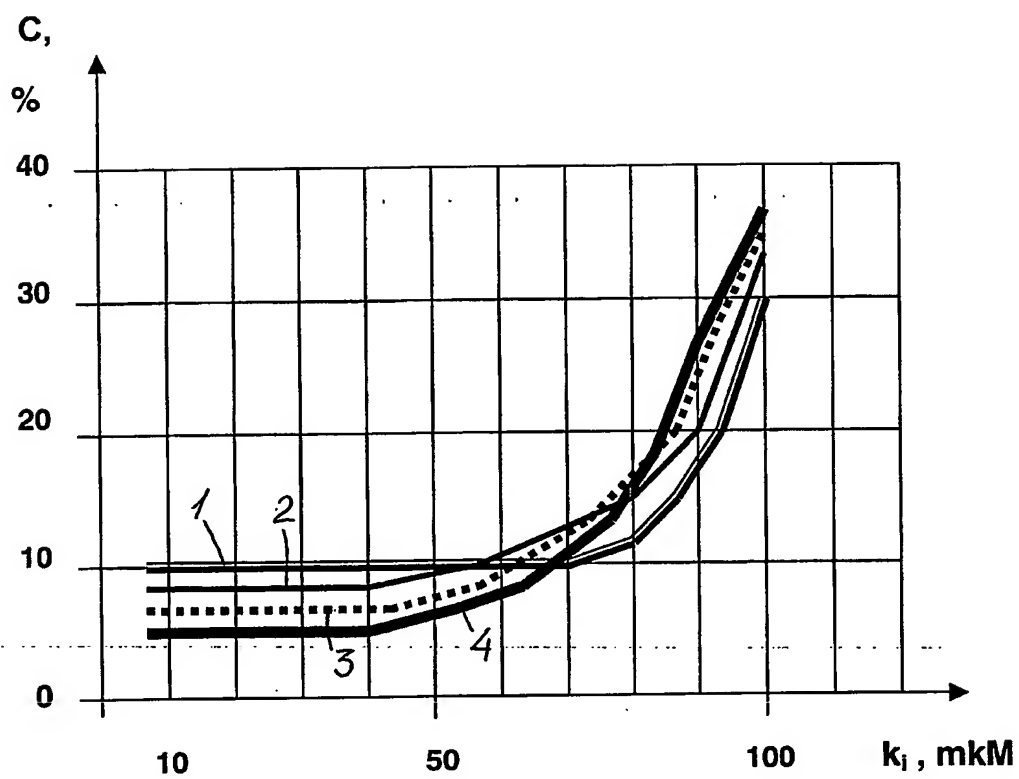


Фиг. 8

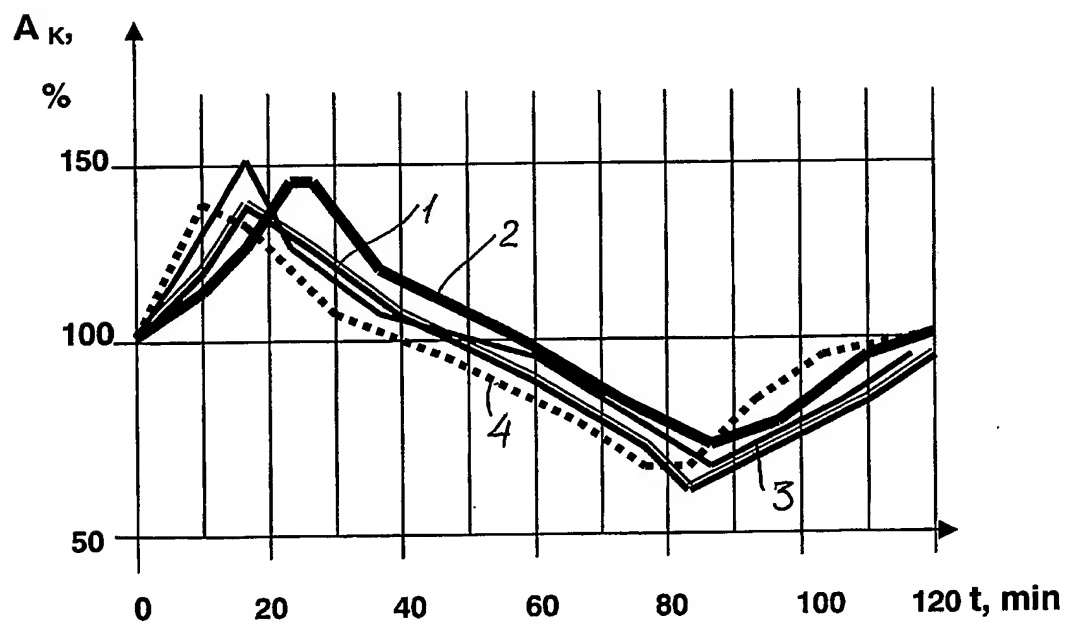


Фиг. 9

6/7

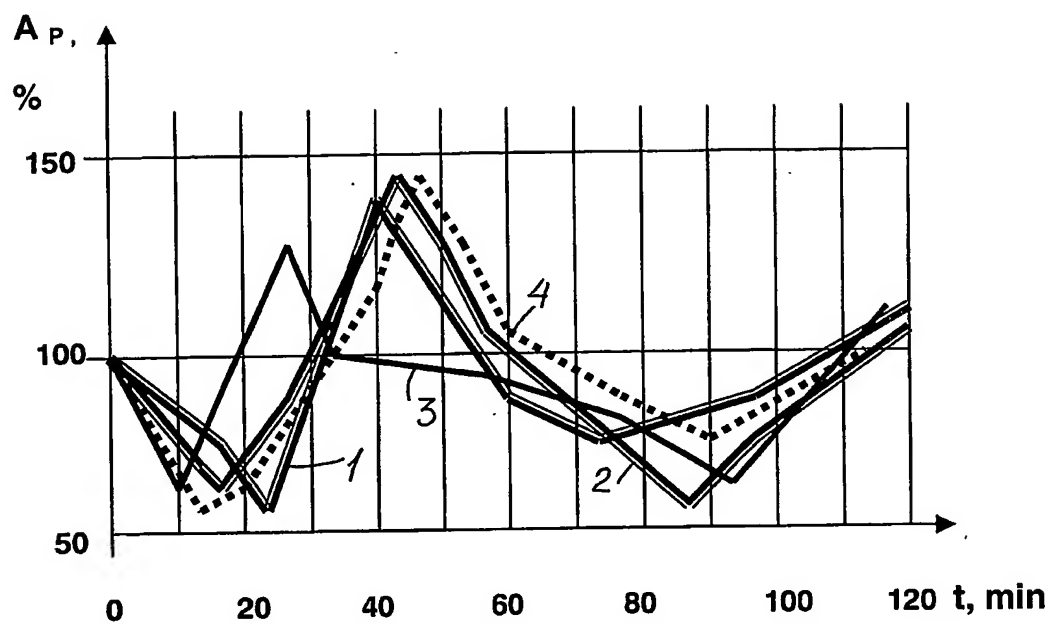


Фиг. 10

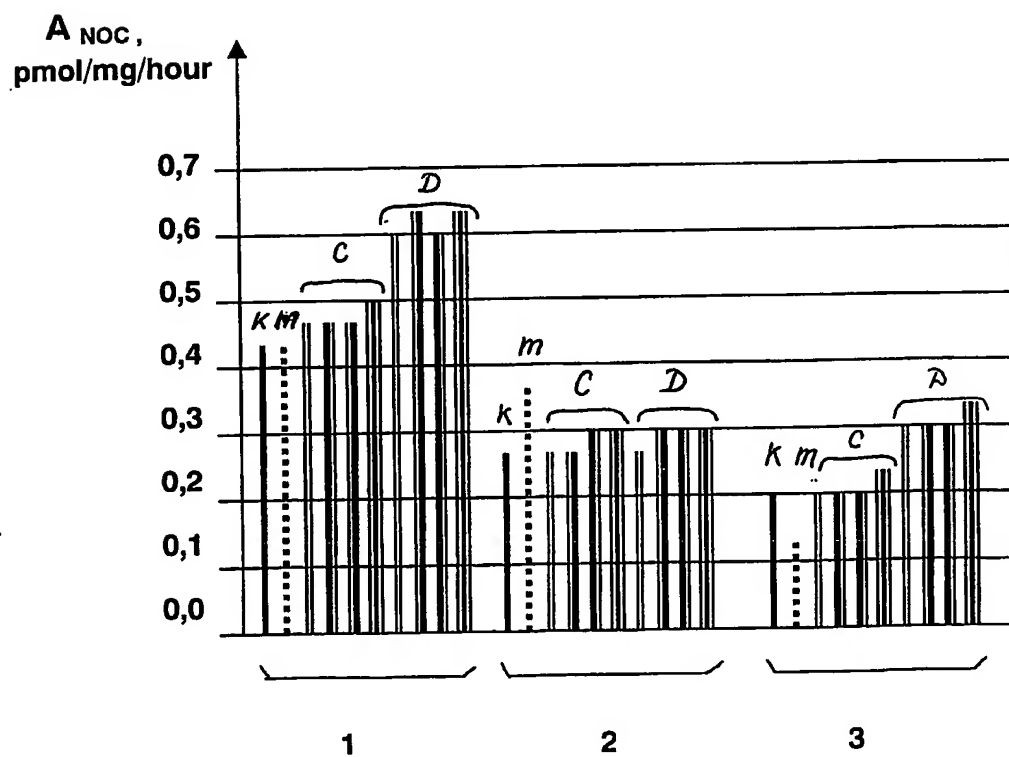


Фиг. 11

7/7



Фиг.12



Фиг. 13

# ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №  
PCT/RU 2003/000346

<b>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:</b> Согласно международной патентной классификации (МПК-7) C07D 487/04, 237/32, C07H 19/06, A61K 31/519, 31/502, 31/7072, A61P 7/02		
<b>В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:</b> Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7: C07D 487/04, 471/04, 237/32, 237/26, C07H 19/06, A61K 31/519, 31/502, 31/7072, A61P 7/02		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):		
<b>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</b>		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
E	RU 2211036 C2 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "АБИДОФАРМА") 27.08.2003, реферат, формула, описание, столбцы 14-20	1,4,5,10-21,23,26-32, 39,40,42
X	RU 2163122 C1 (АБИДОВ МУСА ТАЖУДИНОВИЧ) 20.02.2001, весь документ	1,4,5,10-42
X	RU 2169139 C1 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ЦЕНТР СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЫ "МЕДИКОР") 20.06.2001, реферат, формула	1,4,5,10-42
A	RU 2168511 C2 (ЗЕНЕКА ЛИМИТЕД) 20.08.1998	1-42
A	US 5719151 A (SYDNEY SHALL et al) 17.02.1998	1-42
A	JP 05-078356 A (TAKEDA CHEM IND LTD) 30.03.1993	1-42
последующие документы указаны в продолжении графы С.		
* Особые категории ссылок документов: А документ, определяющий общий уровень техники Е более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее О документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. Р документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д. Т более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения Х документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории & документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска: 05 апреля 2004 (05. 04. 2004)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 22 апреля 2004 (22. 04. 2004)
Наименование и адрес Международного поискового органа Федеральный институт промышленной собственности РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо: Е. Моисеева Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2003/000346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07D 487/04, 237/32, C07H 19/06, A61K 31/519, 31/502, 31/7072, A61P 7/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D 487/04, 471/04, 237/32, 237/26, C07H 19/06, A61K 31/519, 31/502, 31/7072, A61P 7/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	RU 2211036 C2 (OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIJU "ABIDOFARMA"), 27.08.2003, the abstract, the claims, the description, columns 14-20	1,4,5,10-21,23,26-32, 39,40,42
X	RU 2163122 C1 (ABIDOV MUSA TAZHUDINOVICH), 20.02.2001, the whole document	1,4,5,10-42
X	RU 2169139 C1 (ZAKRYTOE AKTSIONERNOE OBSHESTVO "TSENTR SOVREMENNOI MEDITSINY "MEDIKOR"), 20.06.2001, the abstract, the claims	1,4,5,10-42
A	RU 2168511 C2 (ZENKA LIMITED) 20.08.1998	1-42
A	US 5719151 A (SYDNEY SHALL et al) 17.02.1998	1-42
A	JP 05-078356 A (TAKEDA CHEM IND LTD) 30.03.1993	1-42
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search (05. 04. 2004)		Date of mailing of the international search report (22. 04. 2004)
Name and mailing address of the ISA/  <b>RU</b>		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**